UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JERONIMO DIAS DOS SANTOS

ANÁLISE DA MICROBIOTA DOMINANTE DE TRÊS PONTOS AMOSTRAIS DO SOLO DA SAVANA AMAZÔNICA COM POTENCIAL NA PRODUÇÃO DE BIOATIVOS

Macapá/AP
2012

JERONIMO DIAS DOS SANTOS

ANÁLISE DA MICROBIOTA DOMINANTE DE TRÊS PONTOS AMOSTRAIS DO SOLO DA SAVANA AMAZÔNICA COM POTENCIAL NA PRODUÇÃO DE BIOATIVOS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, ofertado pela Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), na área de concentração em **Ensaios Biológicos.**

Orientador: **Prof. Dr. Jean Charles da Cunha Peixoto.**

Macapá/AP

2012

JERONIMO DIAS DOS SANTOS

ANÁLISE DA MICROBIOTA DOMINANTE DE PONTOS AMOSTRAIS DO SOLO DA SAVANA AMAZÔNICA COM POTENCIAL NA PRODUÇÃO DE BIOATIVOS

Dissertação defendida e aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, ofertado pela Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), na área de concentração em **Ensaios Biológicos.**

Macapá/AP, ____ de outubro de 2012.

Prof. Dr. ____
Jean Charles da Cunha Peixoto – Orientador

Prof. Dr. ____
Flavio Henrique Ferreira – Avaliador

Prof. Dr. ____
Raimundo Nonato Picanço Barbosa – Avaliador

Dr. ____
Gilberto Ken-Iti Yokomizo – Avaliador

Prof. Dr. ____
Fernando Antônio de Medeiros – Suplente

Aos meus pais, pela educação.

À minha esposa Léia Pureza, pela motivação e paciência.

Aos colegas de turma que abandonaram o programa por motivos diversos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amapá pelo mestrado ofertado.

À coordenação do programa pela motivação e informações.

Ao Prof. Dr. Jean Charles da Cunha Peixoto pela orientação e incentivo.

Ao Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros por ter disponibilizado o LACEN-AP para estágio.

Aos professores do programa de Pós-Graduação por suas colaborações.

À Prof. MSc Ana Carla de Oliveira Goncalves por ter disponibilizado o Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia.

Aos estagiários do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia pela colaboração.

Ao meu irmão Sandro Dias dos Santos pela ajuda na coleta das amostras de solo.

Aos colegas da turma de 2010 do mestrado em ciências da Saúde, em especial aos colegas Klingerry da Silva Penafort, Claudio José Monteiro da Costa, Ronaldo Mendes Lima, Giovani Rodrigues Cordeiro Mariano, Flávia Laurene Gemaque dos Santos, Edson Fábio Brito Ribeiro e Simoni Lobato da Silva, pela força, ajuda nas atividades, amizade e companheirismo.

À minha esposa, Léia Pantoja Pureza, pelo ajuda na digitação, análise de dados, correções diversas, ajuda nos experimentos laboratoriais e companheirismo.

Ao Prof. Mauro Souza pela ajuda na tradução do Abstract.

Ao Prof. Marcelo Bizerra pela revisão ortográfica final.

RESUMO

O estado do Amapá possui a biodiversidade mais conservada e menos conhecida do Brasil, em especial a biodiversidade microbiana de seu solo, o que inclui fungos, leveduras e bactérias, como os actinomicetos, que são conhecidos pelo seu potencial de síntese de compostos bioativos, como os antimicrobianos, e por este motivo, muitos destes compostos são utilizados principalmente pela indústria farmacêutica. Sendo assim, este projeto de pesquisa realizou uma triagem de micro-organismos a partir de amostras de solo da savana amazônica do Estado do Amapá, e isolou micro-organismos com capacidade de sintetizar compostos bioativos com potencial de antibiose. Para isto, colônias de micro-organismos foram isoladas de amostras de solo em meio seletivo, e estas foram repicadas em meios específicos para crescimento de micro-organismo do solo. Os micro-organismos isolados foram caracterizados pela observação macroscópica e microscópica das características das colônias e dos micélios aéreos por métodos como o microcultivo, e estes também foram classificados como bactérias, fungos e leveduras, além da descrição da morfologia dos micro-organismos e de seus agrupamentos através da coloração de Gram. Foram isolados 40 micro-organismos totais, e todos estes foram testados para antibiose em placa contra micro-organismos-alvo para tal metodologia através do método do traço cruzado (cris-cross). Dos micro-organismos isolados, 6 são bactérias Gram-positivos, 11 Gram-negativos, 7 fungos filamentosos e 16 leveduras, destes, 12 isolados apresentaram atividade antimicrobiana significativa no ensaio de antibiose em placa.

Palavras-chave: Antibiose; antimicrobiano; actinomiceto; biodiversidade; traço cruzado; triagem.

ABSTRACT

The state of Amapá has the most conserved and least known biodiversity of Brazil, especially the microbial biodiversity of its soil, including fungi, yeasts and bacteria, such as actinomycetes, which are known for their potential for the synthesis of bioactive compounds such as antimicrobial agents, and for this reason, many of these compounds are primarily used by the pharmaceutical industry. Therefore, this research project held a screening of microorganism on the soil samples amazonian savanna of the State of Amapá, and isolated microorganisms capable of synthesizing bioactive compounds with antibiosis potential. For that, colonies of microorganisms were isolated from soil samples on selective medium, and these were subcultured in specific media for growth of soil microorganisms. The isolated microorganisms were characterized by macroscopic and microscopic observation of colonies characteristics and the aerial mycelium by methods such as the microculture, and these were also classified as bacteria, fungi and yeasts, as well as the description of the morphology of microorganisms and their groupings by Gram staining. The total of 40 microorganisms were isolated, and all of these were tested for antibiosis plate against standardized microorganisms for such methodology by the method of crossed trace (cris-cross). From the isolated microorganisms, 6 are Gram-positive bacterias, 11 Gram-negative, 7 filamentous fungi and 16 are yeasts, from these last, 12 isolated microorganism have showed significant antimicrobial activity in antibiosis test plate.

Keywords: Antibiosis; antimicrobial; actinomycete; biodiversity; crossed trace; screen.

LISTA DAS FIGURAS

LISTA DAS TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: percentual.
("): segundo.
('): minuto.
(-): negativo.
(+): positivo.
(°): grau.
(x): vezes.
<: menor que.
>: maior que:
±: mais ou menos.
≤: menor/igual a
≥: maior/igual a.
1N: um normal.
2/3: dois terços.
∞: infinito.
ACA: Amido-Caseína Ágar.
ACA+N: Amido-Caseína Ágar acrescido de nistatina.
AIDS (SIDA): síndrome da Imunodeficiência Adquirida.
AN: ágar Nutriente.
Atm: atmosfera.
C: citosina.
$CaCO_3$: carbonato de cálcio
cm = centímetro
$FeSO_4.7H_2O$: sulfato ferroso heptaidratado.
g: grama.
G: guanina.
G+C: par de bases nitrogenadas (guanina pareada com citosina).
h: horas.
HCl: ácido clorídrico.
K_2HPO_4: fosfato de potássio monoácido.
KNO_3: nitrato de potássio.
LB: ágar Luria-Bertani broth.
M: molar.
MAB: ágar Bennett.
mg: miligrama.
$MgSO_4.7H_2O$: sulfato de magnésio heptaidratado.
MH: ágar Müeller-Hinton.

min: minuto.
mL = mililitro.
mm: milímetro.
MRSA: meticilina.
N: norte.
NaCl: cloreto de sódio.
NaOH: hidróxido de sódio.
O: oeste.
ºC: grau célsius.
OMS: Organização Mundial da Saúde.
pH: potencial hidrogeniônico.
PVC: policloreto de vinila.
rpm: rotações por minuto.
SBI: Sociedade Brasileira de infectologia.
SDA: ágar Sabouraud dextrose.
UFAM: Universidade Federal do Amazonas.
UFC/g: Unidade Formadora de Colônia por grama.
UFC: Unidade Formadora de Colônia.
UI/mL: unidades internacionais por mililitro.
β: beta.
μL: microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

Muito se fala da preservação dos ecossistemas naturais do planeta, da conservação da fauna e flora, entretanto, poucos são os temas ambientais direcionados à conservação ou da alteração dos micro-organismos ambientais, como os protozoários, fungos e bactérias naturais de ambientes terrestres e aquáticos; na verdade, pouco se conhece sobre eles, e menos ainda é dada a devida importância a eles. O impacto ambiental causado pela intensificação da exploração agrícola nem sempre recebeu a atenção necessária. A ausência de pesquisas que gerassem conhecimento acerca do funcionamento de ecossistemas e/ou planejamento inadequado na utilização das terras levou a um quadro de intensa degradação ambiental, com perda de recursos não renováveis e da biodiversidade, e não só no Brasil, como em outros países (SHIKI, 1997).

Alterações ambientais vêm provocando a extinção de muitas espécies de micro-organismos terrestres e aquáticos, além de alterações na microbiota natural dos ecossistemas. Por isso, existe uma demanda urgente de se conhecer a ecologia microbiana dos mais variados biomas e ecossistemas que nos rodeiam. Além disso, o maior conhecimento favorecerá uma exploração consciente dos potenciais econômicos, sociais e ambientais implícitos nesses ambientes. Atualmente, existe o consenso de que a diversidade microbiana está diretamente relacionada à estabilidade dos ecossistemas (KENNEDY, 1999).

Muitos micro-organismos, principalmente bactérias e fungos não patogênicos, são empregados comercialmente, e vem sendo utilizados há milhares de anos na produção de alimentos (bebidas e massas fermentadas). A indústria farmacêutica vem dando uma atenção em especial na produção de compostos bioativos oriundos de micro-organismos úteis na terapia de infecções – antimicrobianos (GOTTLIEB, 1973).

Hoje, existe disponível no mercado farmacêutico uma variedade enorme de fármacos antimicrobianos (naturais e sintéticos), que atuam em diferentes vias de ação, portanto, são eficazes normalmente contra um ou poucos tipos de micro-organismos infecciosos (DEMAIN, 2000).

O uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos pela população mundial provocou e provoca a seleção de micro-organismos, tornando-os cada vez mais resistentes a esses mesmos medicamentos além de tornar ineficazes as atuais terapias utilizadas contra eles, uma vez que os micro-organismos que sobrevivem à presença de um antimicrobiano específico multiplicam-se, dando origem às linhagens resistentes a este mesmo antimicrobiano (BARTH, *et al.*, 2001 e OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Temendo a ameaça global de pandemias causadas por micro-organismos multiresistentes aos atuais medicamentos usados como antimicrobianos, que a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Sociedade Brasileira de infectologia (SBI) divulgam a campanha do “uso racional de antimicrobianos”, devido à facilidade de acesso a esses medicamentos resultando na prática comum da automedicação pela população ao utilizar esses antimicrobianos descontroladamente; além de que, muitos destes são ineficientes contra as infecções a qual são utilizados, ou ainda, o uso desses antimicrobianos se dar por períodos muito curtos, ou longos demais, ou em doses que vêm de encontro às necessidades individuais[1].

Possivelmente, outro fator que acarreta a resistência de micro-organismos é o uso inadequado dos antimicrobianos, isso pode ocorrer porque a escolha do medicamento para o tratamento de uma infecção é feita empiricamente, uma vez que, normalmente, a escolha do medicamento acontece sem o conhecimento do patógeno que está causando a infecção, e a decisão é baseada na sintomatologia do paciente e na incidência desses patógenos no hospital ou na região onde se encontra o paciente.

As primeiras observações de resistências de micro-organismos datam da década de 40, onde cientistas puderam observar o aparecimento de cepas de bactérias estreptocócicas, gonocócicas e pneumocócicas que sobreviviam à terapia com sulfas (família de antibacteriano sintético) (STROBEL & DAISY, 2003 e COHEN & TARSKY, 1997).

O aparecimento de micro-organismos multiresistentes, especialmente bactérias e fungos, instiga a comunidade científica mundial a buscar incessantemente novas fontes de antimicrobianos, o que os vem levando a pesquisas de micro-organismos de solo produtores de antimicrobianos, principalmente fungos e certos grupos bacterianos, como os actinomicetos (DEMAIN, 2000).

Havendo a necessidade de se conhecer, conservar e utilizar os recursos naturais da microbiota natural do solo e a urgência de se buscar novos compostos bioativos, principalmente antimicrobianos, que este trabalho de pesquisa objetivou a pesquisa de micro-organismos bacterianos e fúngicos isolados de pontos amostrais do solo da savana do estado do Amapá, e a triagem de micro-organismos com potencial de produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana de interesse farmacêutico.

2 JUSTIFICATIVA

Segundo Meyer *et al.*, (1984), os antimicrobianos são "substâncias antimicrobianas e/ou citostáticas extraídas de organismos vivos, principalmente de origem microbiana, capazes de atuar como tóxicos seletivos, em pequenas concentrações matando ou inibindo o crescimento microbiano patogênico". Esse conceito abrange todas as substâncias produzidas por organismos vivos (KURYLOWICZ, 1981).

O problema da multiresistência de micro-organismos patogênicos foi intensificado em países como o Brasil, onde a população tinha por hábito a automedicação, utilizando-se dos antimicrobianos de maneira indevida, em dosagens ou posologia (TRESOLDI *et al.*, 2000). A pesquisa de novos antimicrobianos sempre continuará, pois tem o objetivo de combater patógenos, bactérias e fungos naturalmente resistentes ou previamente susceptíveis a desenvolver resistência, melhorar propriedades farmacológicas, combater tumores, vírus e parasitas (BACHIEGA *et al.*, 2005).

O aumento significativo na incidência de infecções fúngicas e bacterianas durante as últimas décadas, principalmente em pacientes com câncer, AIDS, ou hospitalizados por períodos prolongados em unidades de terapia intensiva, trouxe a necessidade de se pesquisar novos agentes antimicrobianos (antifúngicos e antibacterianos), com eficiência superior aos utilizados hoje pela clínica médica (BACHIEGA *et al.*, 2005). A pesquisa de novos antimicrobianos produzidos por micro-organismos do solo é bastante comum em países desenvolvidos, e no Brasil o número de pesquisas neste ramo vem crescendo, uma vez que, a maioria dos antimicrobianos de origens naturais é produzida por micro-organismos do solo, em especial os do gênero *Streptomyces*, um actinomiceto (DEAN & BURCHARD, 1996).

A pesquisa com micro-organismos produtores de metabólitos ativos com efeito antagônico contra fungos e bactérias está sendo cada vez mais difundida em todo o mundo (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Igualmente, está se tornando cada vez mais rara a descoberta de novos tipos de antimicrobianos, encontrando-se apenas variações de classes conhecidas desses fármacos (OMURA, 1992), e dessa forma, antimicrobianos pertencentes a uma mesma classe farmacológica, mas que apresentam pequenas modificações na estrutura química de suas moléculas podem apresentar afinidade por diferentes sítios ativos, diferenças na permeabilidade, ou ainda, seletividade por outros tipos celulares. Na pesquisa de novos antimicrobianos, muitos dos novos medicamentos são feitos por modificações nas estruturas químicas de antimicrobianos naturais, ou seja, pela via semissintética (DEMAIN, 2000).

Em consideração à crescente importância clínica, laboratorial e terapêutica dispensada

às infecções fúngicas e bacterianas, inúmeras pesquisas vem sendo desenvolvidas no sentido de obter novos fármacos naturais ou sintéticos, que sejam menos tóxicos e que apresentem ação antimicrobiana contra linhagens de micro-organismos resistentes (LIMA *et al*., 1975). No Brasil, assim como no restante do mundo, pesquisas estão identificando todo ano uma enorme variedade de compostos com ação antimicrobiana obtida de micro-organismos. Por este motivo, é de grande importância que se faça no estado do Amapá um levantamento da microbiota de seu solo, e uma triagem dos micro-organismos com potencial de produção de compostos bioativos para antibiose, uma vez que, a pesquisa literária não apresentou nenhum estudo realizado sobre micro-organismos do solo de qualquer ecossistema amapaense.

A pesquisa do potencial antimicrobiano derivado de fontes naturais (bactérias e fungos) é justificável, tendo em vista o seu baixo custo (BACHIEGA *et al*., 2005). O solo é o maior reservatório natural de micro-organismos, e grande parte destes micro-organismos é encontrada na rizosfera, que pode conter até duas toneladas de micro-organismos por hectare (NWOSU, 2001). Bactérias pertencentes ao grupo dos actinomicetos ocorrem amplamente no solo, principalmente na savana (cerrado), onde desempenham relevante papel biológico. A savana é um ecossistema incomum do bioma amazônico, e o Amapá possui uma pequena área de savana amazônica nativa e pouco conhecida. Em solos de savana com vegetação nativa, a ocorrência das populações de actinomicetos na comunidade microbiana pode ser superior a 75%, com predominância do gênero *Streptomyces* (actinomiceto) (COELHO & DROZDOWICZ, 1978). Os *Streptomyces*, dentre os *Actinomycetes*, lideram a produção de antimicrobianos e moléculas farmacologicamente ativas, enquadradas em uma diversidade de classes, como: aminoglicosídio, macrolídio, ansamacrolídio, beta-lactâmico, peptídeo, glicopeptídio, antraciclina, tetraciclina, nucleotídeo, polieno e quinona (GARCIA-QUINTANA, 1997). Hoje, sabe-se que o maior grupo promissor de micro-organismos capazes de produzir antimicrobianos são os actinomicetos (SANGLIER *et al*., 1993).

É de extrema importância que mais estudos sejam direcionados à microbiota do solo amapaense, em especial a do solo da savana, que sofre constantes ameaças de ocupações e ações das atividades humanas, além do fato de a savana ser uma área relativamente pequena do território Amapaense, e ser o ecossistema mais promissor à descoberta de micro-organismos com potencial de produção de bioativos. Por estes motivos, que este projeto de pesquisa objetiva incentivar e atrair para o Amapá pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novos antimicrobianos de origem natural, produzidos por micro-organismos do solo, uma vez que o Amapá ainda mantém seu meio ambiente como um dos mais preservados do Brasil, e possui um mosaico de ecossistemas bem distintos com sua fauna, flora e microbiota,

especialmente a do solo, com possivelmente muitas espécies endêmicas, e pouco estudadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Micro-organismos do solo de savanas

A savana é um dos grandes biomas do planeta em diversidade de vida, ficando atrás apenas do bioma Amazônico (AGUIAR *et al.*, 2004). O Amapá diferencia-se dos demais Estados amazônicos por possuir dentro de seu território, formado por ecossistemas típicos da Amazônia, uma pequena área de savana distribuída geograficamente em mosaico. Em estudos de prospecção de micro-organismos presentes no solo de savanas, Cuppels & Kelman, (1973) observaram que entre as bactérias presentes, 93% eram Gram-positivos e apenas 7% Gram-negativos. As Gram-negativas foram classificadas como bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos, fermentadores e também em bacilos e cocos Gram-negativos, aeróbios/microaerófilos, não fermentadores. O que chama a atenção é o baixo percentual de bactérias Gram-negativos neste tipo de solo, apesar destas apresentarem grande capacidade de realizar alterações químicas, tais como metabolização e/ou decomposição de proteínas, celulose, herbicidas e capacidade de fixação de nitrogênio (HOLDING, 1960). Em solos de savanas com vegetação nativa, a ocorrência das populações de actinomicetos na comunidade microbiana pode ser superior a 75%, com predominância do gênero *Streptomyces* (COELHO & DROZDOWICZ, 1978).

Na década de 80, a agricultura brasileira sofreu um grande impulso e as áreas de plantações se estenderam para a savana. Devido à composição do solo esse bioma exigia uma grande quantidade de herbicidas, cuja aplicação cresceu numa escala de 540% entre 1978 e 1998 (Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2006). No Amapá, os poucos empreendimentos industriais, silviculturas, agriculturas familiares e a prática da pecuária vêm priorizando a ocupação do território de savana. Perturbações no solo de um ecossistema natural através de práticas agrícolas, como a calagem, têm resultado em desequilíbrios das populações na comunidade microbiana, favorecendo as populações de actinomicetos (BALDANI *et al*., 1982; KAMEL *et al*., 1989; CATTELAN & VIDOR, 1990 e PEREIRA *et al*., 1996). Os actinomicetos são micro-organismos promotores de antibiose por produção de compostos antimicrobianos, e um aumento em sua população natural acaba por alterar toda a comunidade microbiana do solo.

Segundo Duarte *et al.*, (2001), para melhor entendimento da ecologia das comunidades microbianas residentes no solo, é preciso que se conheçam como essas comunidades estão estruturadas sob a prevalência e as mudanças de condições ambientais, a começar pela

pesquisa dos micro-organismos predominantes nestas comunidades do solo.

3.2 Os actinomicetos

Os taxonomistas conflitaram por certo tempo a respeito da classificação dos micro-organismos da ordem *Actinomycetales*, pois estes apresentam características que os tornam difíceis de classificá-los como fungos ou bactérias. Os micologistas classificavam as espécies dessa ordem como fungos, em virtude da presença de estruturas filamentosas e da formação de conídios nos ramos aéreos (WAKSMAN, 1950 e GOTTLIEB, 1973). Na década de 80, os actinomicetos foram classificados como bactérias, por não apresentarem membranas nucleares e certas estruturas celulares como mitocôndrias e cloroplastos, e por serem sensíveis à lisozima e à maioria dos agentes antimicrobianos, além de outras características como a composição da parede celular (GOTTLIEB, 1973; KURYLOWICZ, 1981 e LOCCI, 1989).

Os actinomicetos são encontrados, sobretudo no solo, onde desempenham papel fundamental na decomposição da matéria orgânica e na reciclagem dos nutrientes. Estima-se que cada grama de solo contém 10^6–10^9 células destas bactérias, aproximadamente 30% da população total de micro-organismos do solo de savanas são de actinomicetos (KENNEDY, 1999). No entanto, os actinomicetos podem ser encontrados nos mais diversos ambientes naturais, como águas, em vegetais em decomposição, nódulos de raízes de plantas, sedimentos, fezes de animais, lodo ativado, produtos alimentícios, até mesmo, em associação com liquens (MCCARTHY & WILLIAN, 1992; GONZÁLEZ *et al.*, 2005; GROTH *et al.*, 1999 e KENNEDY, 1999). A ocorrência de actinomicetos em ambientes aquáticos pode estar relacionada com a lixiviação do solo, esta hipótese deve-se ao fato da diversidade taxonômica de actinomicetos do solo ser a mesma do ambiente aquático (ARAÚJO, 1998).

Os actinomicetos pertencem a um grupo de micro-organismos heterogêneos de bactérias Gram-positivo que apresentam em seu genoma altas concentrações de guanina e citosina (G+C), e crescem com um aspecto filamentoso e ramificado, sendo na sua maioria aeróbicas e com de crescimento relativamente lento (CROSS, 1989; EMBLEY; STACKEBRANDT, 1994; GOODFELLOW, 1989; MCCARTHY & WILLIAN, 1992 e MONCIARDINI *et al.*, 2002). Podem ser esféricas ou bacilares, formam filamentos e hifas, que compõem um micélio de coloração variada. Os filamentos consistem em células procarióticas longas com vários nucleóides (EMBLEY & STACKEBRANDT, 1994). O micélio dos actinomicetos é uma vantagem para o micro-organismo, pois ele tem a capacidade de aderir ou penetrar em tecidos e ajudam a secretar enzimas e outros metabólitos.

Com a aproximação do micélio aos substratos, o indivíduo precisa secretar apenas uma quantidade pequena de enzima para atingir níveis efetivos (CHATER, 2006).

A importância econômica e farmacêutica dos actinomicetos baseia-se a produção de antimicrobianos, vitaminas e enzimas, além de ter um papel promissor no futuro da biotecnologia (GOODFELLOW *et al.*, 1984). Estes micro-organismos são metabolicamente diversos e são capazes de utilizar fontes variadas de carbono e energia. Desta maneira eles podem ser autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos ou fototróficos (KENNEDY, 1999). A maioria é aeróbia, mas existem alguns actinomicetos anaeróbios ou anaeróbios facultativos, eles crescem, preferencialmente, em solos de pH neutro à alcalino, embora muitos actinomicetos cresçam em solos ácidos (ARAÚJO, 1998).

Os actinomicetos são responsáveis por mais de 2/3 da produção total de antimicrobianos, e o gênero *Streptomyces* com seus metabólitos secundários respondem por 70 a 80% dessa produção (CHALLIS & HOPWOOD, 2003). Cepas do gênero *Streptomyces*, quando testadas *in vitro*, têm apresentado grande potencial para produção de antimicrobianos que reduzem ou inibem o desenvolvimento de patógenos fungicos e bacterianos (KIM *et al*., 2002; OUHDOUCH, *et al*., 2001 e BRESSAN, 2003).

Na identificação dos actinomicetos são empregadas várias técnicas bioquímicas, moleculares, além da analise macroscópica e microscópica das diferenças morfológicas desses micro-organismos. Na análise da morfologia dos actinomicetos, deve-se observar a cor do micélio e o tipo de esporo, quando presente. Para tanto, é importante utilizar um meio de cultura que possibilite uma boa esporulação e a diferenciação do micélio. (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966 e LECHEVALIER, 1989).

3.3 Metabólitos secundários

Todos os organismos vivos crescem e se reproduzem utilizando rotas metabólicas muito semelhantes, ou até mesmo idênticas, para produção de energia e de outros compostos, principalmente os estruturais. Essas reações metabólicas fazem parte do metabolismo primário. No entanto, existem outras rotas metabólicas que possibilitam aos organismos produzirem os mais diversos tipos de compostos, alguns inclusive restritos a certos gêneros ou espécies. Essas rotas constituem o metabolismo secundário, ou seja, seus produtos não são essenciais para a vida do organismo. Ainda não se sabe exatamente a função de muitos produtos do metabolismo secundário, apesar de se saber que alguns desses metabólitos podem conferir uma vantagem natural ao organismo produtor em relação aos outros organismos que

não os possuem (VINING, 1986).

Os fatores que desencadeiam a produção de metabólitos secundários geralmente estão ligados à escassez de algum nutriente essencial como o carbono, nitrogênio ou fosfato, e normalmente, os metabolismos secundários são produzidos na fase estacionária do indivíduo, mas também, podem ser sintetizados durante o seu crescimento (VINING, 1986 e OCHI, 2007).

Conceitualmente, o metabolismo secundário revela-se pela sua ausência na função metabólica essencial dos organismos (MARTIN & DEMAIN, 1980). O metabolismo secundário pode ser reconhecido como um fenômeno geral de manutenção de algumas espécies. Usualmente é associado com plantas e micro-organismos, entretanto, existem muitos exemplos no reino animal (MANN, 1978).

A produção de metabólitos secundários está distribuída dentre os mais variados reinos. Dentre as bactérias, o destaque fica para os actinomicetos, que assim como os fungos, sintetizam enzimas e a maioria dos antimicrobianos conhecidos (VINING, 1986).

Na pesquisa, a característica mais marcante do grupo dos actinomicetos é a sua capacidade de produzir metabólitos secundários, úteis na indústria farmacêutica. Os actinomicetos são capazes de sintetizar diversos metabólitos secundários, como vários tipos de enzimas, vitaminas, e antimicrobianos que apresentam propriedades antifúngicas e antibacterianas (WOODRUFF, 1980; CHATER, 2006; KENNEDY, 1999 e PELÁEZ, 2006).

3.4 Compostos Antimicrobianos

Os antimicrobianos são compostos químicos específicos produzidos por diversas espécies de micro-organismos vivos, principalmente bactérias e fungos, capazes de inibir, em baixas concentrações, os processos vitais de uma ou mais espécies de organismos, ou seja, são produtos de origem natural (KOROLKOVAS, 1999). Antimicrobianos são importantes para a medicina terapêutica e a indústria, desempenhando funções antitumorais, imunossupressoras, herbicidas e antimicrobianas (antifúngicas, antibacterianas e antiprotozoáricas) (OUHDOUCH *et al.*, 2001).

Antibióticos são compostos com a mesma função que os antimicrobianos, porém podem ser também de origem sintética (HECK, 2007). Atualmente, o uso destes dois termos não segue exatamente esta definição, podendo então ser usado o termo antimicrobianos para incluir agentes antibióticos sintéticos, como as sulfonamidas e as quinolonas (CHAMBERS, 2003). Sendo assim, nesta pesquisa os termos antimicrobianos e antibióticos foram tratados

como sinônimos, porque ambos os termos se aplicam a compostos isolados de micro-organismos com ação ativa contra bactérias e fungos.

3.4.1 Classificação dos antimicrobianos

A classificação dos antimicrobianos depende do micro-organismo ao qual atuam, como por exemplo:

- Antibacterianos: são compostos ativos contra bactérias;
- Antifúngicos: são compostos ativos contra fungos;
- Antivirais: são compostos ativos contra vírus;
- Antiparasitários: são compostos ativos contra parasitas, como os helmintos;
- Antiprotozoários: são compostos ativos contra protozoários.

Também podemos classificar os antimicrobianos pelo seu efeito nos micro-organismos, como por exemplo:

- Bactericidas: matam bactérias;
- Bacteriostáticos: inibem o crescimento de bactérias, necessitando da ação do sistema imune do hospedeiro para eliminação do micro-organismo.
- Fungicidas: matam fungos;
- Fungistáticos: inibem o crescimento de fungos.

Outras formas de se classificar os antimicrobianos são:

I. **Pelo mecanismo de ação:**

- Agentes que inibem a síntese da parede celular bacteriana. Por exemplo: β-lactâmicos, vancomicina e bacitracina;
- Agentes que agem diretamente na membrana plasmática do micro-organismo, afetando sua permeabilidade e causando o extravasamento de compostos extracelulares. Por exemplo: Polimixina e anfotericina B;
- Antimetabólitos que bloqueiam rotas específicas. Por exemplo: Sulfonamidas e trimetoprim;
- Agentes que afetam metabolismo bacteriano dos ácidos nucléicos. Por exemplo: Quinolonas e rifampicina.

- Agentes que inibem a síntese proteica, os quais podem ser subdivididos em:

A. Atuam na subunidade 30S do ribossomo. Por exemplo: aminoglicosídicos.

B. Atuam na subunidade 50S do ribossomo. Por exemplo: macrolídeos.

C. Agentes antivirais, também subdivididos em várias classes. Por exemplo: aciclovir.

II. Pela estrutura química da molécula do antimicrobiano:

Esta classificação provavelmente é a mais ampla e mais complexa, visto que existem no mercado mais de 15 classes de antimicrobianos com estruturas diferentes (Levy e Marshall, 2004). São exemplos de alguns antimicrobianos importantes:

- Sulfonamidas;
- Quinolonas;
- β-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactâmico);
- Aminoglicosídeos;
- Macrolídeos;
- Tetraciclinas;
- Glicopeptídicos;
- Estreptograminas;

(MACHADO & BARROS, 2001; CHAMBERS, 2003 e LEVY & MARSHALL, 2004).

3.4.2 Histórico dos antimicrobianos

Durante toda a evolução da humanidade temos os relatos de várias tentativas do uso de substâncias e de materiais com a intenção de secar lesões supurativas, curar febres, melhorar as dores. Há descrições sobre o uso de antimicrobianos desde 3000 anos atrás, quando médicos chineses utilizavam fungos filamentosos, os quais eram chamados de bolores para o tratamento de tumores inflamatórios e feridas infecciosas. Provavelmente os fungos em questão produziam substâncias antimicrobianas desconhecidas na época. Os médicos indianos também faziam uso de fungos há mais de 1500 anos. Eles recomendavam a ingestão de fungos filamentosos, que eles chamavam de "mofos", para a cura de disenterias (TAVARES, 2001).

Apesar do uso milenar dos antimicrobianos, a pesquisa por medicamentos só começou a ser desenvolvida no século XVI, com o advento da alquimia. Nessa época foi descoberta uma das primeiras substâncias antimicrobianas: a quinina, obtida de uma árvore do Peru chamada *Cinchona*, utilizada no tratamento da malária por seu efeito antiprotozoárico (TAVARES, 2001).

Em 1877, Pasteur e seu pupilo Jules Joubert foram os primeiros a reconhecer o potencial clínico de produtos microbianos como agentes terapêuticos. Eles observaram que o crescimento do bacilo Anthraz na urina podia ser inibido por adição de outros micro-organismos inoculados junto a ele (TAVARES, 2001).

A definição do termo antibiótico foi inicialmente proposta por Vuillemin em 1889 como "antibiose", que definia o antagonismo dos seres vivos em geral. O nome antibiótico foi primeiramente usado por Waksman em 1942, e que o redefiniu como sendo uma substância produzida por micro-organismos (bactérias e fungos) antagonista ao desenvolvimento, ou à vida de outros micro-organismos em altas diluições no meio bioquímico em nosso corpo. Dez anos antes, em 1932, Gehard Domagk já havia demonstrado a atividade antibacteriana das sulfas *in vivo*, antes elas eram utilizadas apenas como corantes. Dessa data até 1942, várias sulfas surgiram, algumas delas ainda são utilizadas hoje, como sulfadiazina, sulfatiazol, sulfaguanidina e sulfamerazina (TAVARES, 2001).

A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1928, mas nessa data sua descoberta não foi valorizada. Ela somente foi usada para o tratamento de infecções humanas em 1941 quando Florey e Chain retomaram as pesquisas (TAVARES, 2001). O sucesso terapêutico da penicilina incentivou os cientistas a buscar novos compostos antimicrobianos provenientes de micro-organismos. Selman Walksman, chefe de um grupo de cientistas da Universidade de Rutgers, de Nova Jersey, dedicou-se ao estudo de micro-organismos do solo, especialmente actinomicetos, e em 1940 descobriu a actinomicina, e em 1942 a estreptotricina, ambas tóxicas para uso humano. Porém, em 1943 este mesmo grupo descobriu a estreptomicina, a qual revolucionou a terapêutica contra infecções por causa de sua ação contra bacilos Gram-negativos e, sobretudo, contra *Mycobacterium smegmatis*, promovendo a cura da tuberculose (TAVARES, 2001 e CHAMBERS, 2003).

3.4.3 Os antimicrobianos na atualidade

Passados mais de 50 anos do início da produção em larga escala comercial da penicilina, e da descoberta de muitos outros antimicrobianos de origem microbiana e de

outros antimicrobianos terem sido modificados por síntese química, a luta contra os micro-organismos patogênicos está longe de acabar. Isto torna a pesquisa de novos antimicrobianos, a área mais importante da microbiologia farmacêutica atual. Os programas de rastreio intensivo em todos os países levam ao aumento contínuo do número de antimicrobianos descritos: 513 em 1961, 7650 em 1985 e mais de 8500 até o ano de 1996, embora apenas cerca de 130 sejam produzidos industrialmente (MADIGAN *et al*., 1997).

Hoje há no mercado uma vasta gama de medicamentos antimicrobianos disponíveis. Estes apresentam diferentes mecanismos de ação e, por isso, são eficazes contra um ou outro tipo de micro-organismo. Os antimicrobianos também diferem quanto a sua origem e obtenção, logo, os custos também variam bastante (HECK, 2007).

3.5 A resistência microbiana

A descoberta das sulfonamidas e da penicilina parecia ter acabado com o problema das infecções bacterianas. Entretanto, já na década de 30 apareceram linhagens de *Streptococcus pyogenes* em hospitais militares britânicos que não respondiam mais ao tratamento com sulfas, e nos anos 40 cepas de *Staphylococcus aureus* se mostraram resistentes à penicilina em hospitais de Londres (LEVY & MARSHALL, 2004). O homem passou a conhecer, então, as bactérias resistentes.

A resistência microbiana é a habilidade desses em sobreviver na presença de um antimicrobiano. Ela pode ser intrínseca (ou natural), determinada pelo gênero da bactéria e pelo espectro de ação do antimicrobiano; ou adquirida, a qual pode ser manifestada apenas por algumas cepas de uma mesma espécie bacteriana, sendo este o resultante de uma mutação de um gene ou da aquisição de material genético novo (BARTH *et al.*, 2001).

Os primeiros casos de resistência antimicrobiana aconteceram, certamente, por um processo de mutação espontânea no cromossomo bacteriano. Erros na síntese de DNA durante a replicação podem acontecer e levar à mutação espontânea de um par de bases numa taxa de 10^{-7} e 10^{-8}, ou seja, este é um evento bastante raro. Uma mutação que tem como resultado a resistência a algum agente antimicrobiano então, é um evento raríssimo, visto que uma mutação pode causar outros efeitos ao micro-organismo (LEVY & MARSHALL, 2004).

O aparecimento de organismos resistentes ocorre somente quando estes entram em contato com antimicrobianos, isso porque o medicamento inibe somente o crescimento das cepas suscetíveis, selecionando as cepas resistentes. Assim é fácil compreender porque são encontradas mais cepas resistentes em hospitais. No entanto, o uso indiscriminado de agentes

antimicrobianos na agricultura e/ou pecuária predispõe o aparecimento de resistência no ambiente (LEVY & MARSHALL, 2004).

A resistência antimicrobiana pode ser transmitida de maneira vertical para toda a progênie do micro-organismo mutante, ou ainda ser transmitida de forma horizontal para outros micro-organismos, inclusive de gêneros diferentes. A transmissão horizontal em bactérias pode ser feita através de elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, bacteriófagos, transposons e ainda por transformação (LEVY & MARSHALL, 2004).

Os mecanismos de resistência microbiana podem ser divididos em três categorias gerais:

I. **Inativação enzimática:** o micro-organismo-controle é capaz de produzir uma enzima que modifica o antimicrobiano em algum local específico tornando-o inativo. Nesse caso podemos enquadrar a resistência a antimicrobianos aminoglicosídicos e β-lactâmicos.

II. **Alteração do sítio de ação:** ocorre uma modificação no local onde o antimicrobiano se liga à célula, tornando essa ligação, com a célula, fraca ou impedindo-o de se ligar à mesma.

III. **Alteração do transporte do antimicrobiano:** nesse caso a bactéria pode diminuir a permeabilidade da membrana, reduzindo o número de porinas ou modificando-as, ou a bactéria desenvolve um mecanismo de refluxo do antimicrobiano através do qual a célula transporta o antimicrobiano para fora dela, impedindo-o de agir (LEVY & MARSHALL, 2004).

Devido ao uso excessivo de antimicrobianos, tem aumentado o número de micro-organismos resistentes. Por mais de duas décadas tem-se isolado de hospitais cepas de *Sfaphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que são resistentes a muitos antimicrobianos (CEYLAN et *al.*, 2008). Um fator agravante, é que muitas vezes um único micro-organismo é resistente a vários tipos diferentes de antimicrobianos, eles são os chamados micro-organismos multiresistentes, como as superbactérias (LEVY & MARSHALL, 2004). Outro problema sério é o fato de, uma vez adquiridos os genes de resistência, eles não são facilmente perdidos, ao contrário, eles são relativamente estáveis. Assim, as opções de tratamento vão ficando cada vez mais limitadas (LEVY, 2005).

Pacientes hospitalizados infectados com micro-organismos resistentes permanecem no hospital o dobro do tempo em relação às pacientes infectados com micro-organismos

sensíveis. Além disso, eles apresentam maior morbidade e mortalidade, sem contar o aumento do custo deste paciente para o sistema de saúde (LEVY & MARSHALL, 2004).

Nos hospitais americanos, mais de 70% das bactérias causadoras de infecções hospitalares são resistentes a, pelo menos, um antimicrobianos comumente usado no tratamento de doenças bacterianas (HECK, 2007). Desta forma, é de grande importância a busca contínua por novos metabólitos secundários ativos contra diferentes micro-organismos patogênicos.

3.6 O desenvolvimento de novos antimicrobianos

Atualmente, há no mercado mais de 200 drogas com atividade antimicrobiana. De 1998 a 2005, somente 9 novos antimicrobianos foram aprovados pela OMS, dos quais apenas 2 apresentavam um novo mecanismo de ação. Até o ano de 2004, aproximadamente 550 novos medicamentos estão em processo de pesquisa, e desse total, apenas 6 são da categoria dos antimicrobianos (OVERBYE & BARRET, 2005).

Está se tornando cada vez mais rara a descoberta de novos tipos de antimicrobianos, encontrando-se apenas variações de classes conhecidas (OMURA, 1992 e KNOWLES, 1977). A falta de novos antimicrobianos é vista com grande preocupação pela comunidade científica, pois as doenças infecciosas são a segunda causa de morte em países desenvolvidos. Para agravar a situação, surgem cepas de bactérias pan-resistentes (que não respondem a quase nenhum antimicrobiano), obrigando assim, o uso de antimicrobianos muito tóxicos ao homem como a Polimixina B e a Colistina (PROJAN, 2003 e NORRBY *et al.*, 2005).

Se for verdade que compostos da mesma classe química apresentam perfis de resistência antimicrobianas semelhantes, não é menos correto que pequenas variações na estrutura podem provocar grandes variações na farmacocinética e toxicidade. Assim, antimicrobianos da mesma classe, mas com pequenas diferenças estruturais, podem apresentar atividade seletiva contra diferentes micro-organismos (UJIKAWA, 2003).

A fonte de maior potencial para a descoberta de novos compostos antimicrobianos são os produtos naturais de origem microbiana, sobretudo actinomicetos e fungos (PELÁEZ, 2006). A grande vantagem na utilização de compostos originários de micro-organismos é que eles geralmente são produzidos dentro da célula, e muitas vezes são moléculas capazes de penetrar em outras células. Dessa forma, não há o problema de permeabilidade na membrana celular, que muito compostos sintéticos apresentam, tornando necessário um estudo mais complexo, longo e caro (OVERBYE & BARRETT, 2005).

Outra comprovação de que os produtos naturais são a melhor fonte de pesquisa de antimicrobianos é que nos últimos 30 anos, somente as oxazolidinones são de origem totalmente sintéticas (OVERBYE & BARRETT, 2005; PROJAN, 2003 e NORRBY *et al*., 2005). Os actinomicetos têm sido o grupo de organismos mais bem sucedido na busca de compostos antimicrobianos, inclusive modelos matemáticos sugerem que o número de antimicrobianos a serem descobertos a partir somente do gênero *Streptomyces* pode ser maior que 10^5 (WATVE *et al*., 2001 e PELÁEZ, 2006).

4 OBJETIVOS DA PESQUISA

4.1 Geral:

✓ Analisar a microbiota dominante de micro-organismos bacterianos e fúngicos de amostras coletadas de pontos do solo da savana amazônica amapaense, no período central da estiagem amazônica, e triar os micro-organismos que apresentarem potencial na produção de bioativos com atividade antimicrobiana.

4.2 Específicos:

✓ Plaquear, isolar e purificar em meios sólidos seletivos, colônias de micro-organismos de amostras de solo coletadas em três pontos amostrais da savana amazônica amapaense;

✓ Caracterizar os micro-organismos por meio da macromorfologia e micromorfologia observada em microcultivos e microscopia óptica pela coloração de Gram;

✓ Triar os micro-organismos com atividade positiva para antibiose em placa pelo método do traço cruzado (Cris-Cross).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Caracterização e localização das áreas de coleta

Para realizar o isolamento de colônias microbianas, três sítios de coletas foram selecionados, e de cada sítio, em dois pontos distintos amostras foram coletadas (pontos A e pontos B), onde sempre os primeiros pontos (pontos A) eram selecionados no relevo mais elevado em relação à planície da savana, geralmente no topo de elevações, e nos segundos pontos (pontos B) eram selecionados os relevos menos elevados da savana, em vales rodeados pelas elevações. De cada ponto de coleta, amostras de solo foram colhidas em duas profundidades diferentes, uma de 0 a 5 cm e a outra de 5 a 10 cm de profundidade, totalizando 12 amostras de solo (tabela 01).

Cada um das doze amostras foram plaqueadas em três diluições em triplicata, totalizando 108 placas, que posteriormente foram repicadas em seis meios de crescimento diferentes sucessivas vezes até a obtenção de colônias puras, e como muitos micro-organismos do solo, como os actinomicetos, apresentam um lento crescimento, não foi possível aumentar o número de sítios de coleta de amostras de solo.

O primeiro ponto de coleta, o ponto 1A, cujas coordenadas são: latitude: 0°13'5.47"N e longitude: 51°13'9.75"O, localizado na porção elevada da planície, apresentava uma vegetação rasteira espaçada, com poucas gramíneas e arbustos retorcidos espaçados uns dos outros, o solo era seco, marrom escurecido e rochoso (figura 01).

Figura 01. Fotografia do ponto 1A, sítio 1.



Fonte: o autor.

O segundo ponto de coleta, o ponto 1B do sítio 1, possuindo as seguintes coordenadas: latitude: 0°13'5.19"N e longitude: 51°13'8.98"O, sendo um vale rodeado por elevações, sua vegetação rasteira era fechada, recobrindo todo o solo, apresentava poucos arbustos de médio e pequeno porte, o solo arenoso quase não apresentava pedregulhos, de coloração marrom escuro e úmido (figura 02).

Figura 02. Fotografia do ponto 1B, sítio 1.



Fonte: o autor.

O ponto de coleta 2A, de coordenadas: latitude: 0°13'5.18"N e longitude: 51°21'8.97"O, localizado em um nível levemente mais elevado em relação à planície da

savana. O ponto da coleta apresentava uma vegetação rasteira, seca e escassa, com poucas gramíneas e poucos arbustos retorcidos espaçados uns dos outros, o solo apresentava-se seco, amarelado, rochoso e compactado (figura 03).

Figura 03. Fotografia do ponto 2A, sítio 2.



Fonte: o autor.

O segundo ponto de coleta, o ponto 2B do sítio 2, possuindo as seguintes coordenadas: latitude: 0°13'3.91"N e longitude: 51°21'6.73"O, situado em um vale rodeado por elevações, sua vegetação rasteira era bastante fechada, com gramíneas recobrindo todo o solo, apresentava algumas árvores de grande porte e muitas palmeiras, o solo apresentava-se arenoso, encharcado, pouco compactado, de tonalidade marrom escurecida (figura 04).

Figura 04. Fotografia do ponto 2B, sítio 2.



Fonte: o autor.

O ponto de coleta 3A, de coordenadas: latitude: 0°58'9.93"N e longitude: 51°6'4.22"O, localizado em nível plano em relação ao relevo da savana. O ponto para coleta apresentava uma vegetação rasteira formada por gramíneas que recobria parcialmente o solo, e poucos arbustos retorcidos espaçados uns dos outros, o solo era pouco úmido, de tonalidade marrom clara, com poucos pedregulhos, levemente arenoso e pouco compactado (figura 05).

Figura 05. Fotografia do ponto 3A, sítio 3.



Fonte: o autor.

O segundo ponto de coleta, o ponto 3B do sítio 3, possuindo as seguintes coordenadas: latitude: 0°58'8.53"N e longitude: 51°6'5.32"O. Situado na porção de relevo menos elevada

em relação à planície da savana, rodeado por pequenas elevações, sua vegetação rasteira recobria totalmente o solo, com gramíneas pequenas recobrindo todo o solo, apresentava alguns arbustos de médio porte dispersos e algumas poucas concentrações de palmeiras formando ilhas espaçadas, o solo levemente arenoso, umedecido, pouco compacto, de tonalidade marrom escura, e quase não apresentava pedregulhos (figura 06).

Figura 06. Fotografia do ponto 3B, sítio 3.



Fonte: o autor.

O sítio de coleta 1 situa-se à margem esquerda da BR 156, a aproximadamente 36 quilômetros ao sul da capital do Estado do Amapá, e foi selecionado por apresentar características bem distintas da savana amazônica amapaense, e por estar localizado num trecho ainda não asfaltado da rodovia BR 156, havendo aparentemente pouca influência humana, possivelmente devido ao difícil acesso, apresentando-se visualmente com características de savana nativa. Esse sítio de coleta apresenta relevo bem acidentado, com bastantes elevações, encostas e vales. Nesse sítio, foram selecionados dois pontos de coletas, o primeiro num relevo mais acentuado – uma elevação, e o segundo num vale (figura 07).

Figura 07. Fotografia espacial da localização dos pontos 1A e 1B do sítio 1 de coleta.



Fonte: Google Earth, data da imagem: 28/9/2008.

Seguindo 15 quilômetros mais ao sul do sítio de coleta 1 pela BR 156, encontra-se ao lado direito da rodovia o Sítio 2, onde dois pontos foram selecionados para coleta de solo, o ponto 2A e 2B (figura 08).

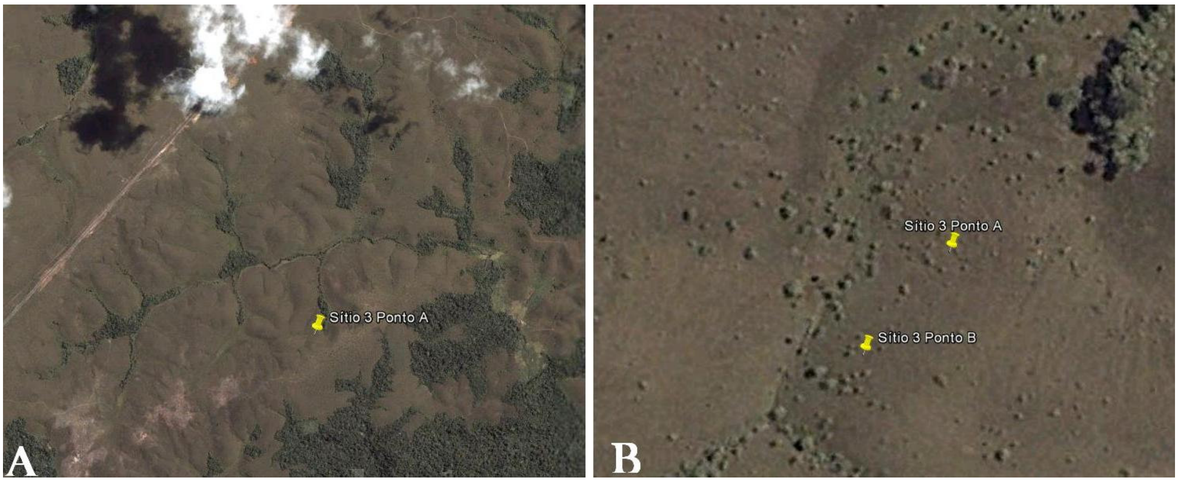
Figura 08. Fotografia espacial da localização dos pontos 2A e 2B do sítio 2 de coleta.



Fonte: Google Earth, data da imagem: 28/9/2008.

O terceiro sítio escolhido para coleta fica ao norte da BR 156, a aproximadamente 190 quilômetros da capital Macapá, adentrando-se 200 m do lado direito da rodovia, buscando assim, pontos de coletas com vegetação o mais nativa possível. Do terceiro sítio, dois pontos foram selecionados para coleta, o ponto 3A e 3B (figura 09).

Figura 09. Fotografia espacial da localização dos pontos 3A e 3B do sítio 3 de coleta. Imagem **A** - localização do ponto 3A em relação à rodovia. Imagem **B** – ponto 3A e ponto 3B.



Fonte: Google Earth, data da imagem: 8/10/2008.

5.2 Coleta das amostras

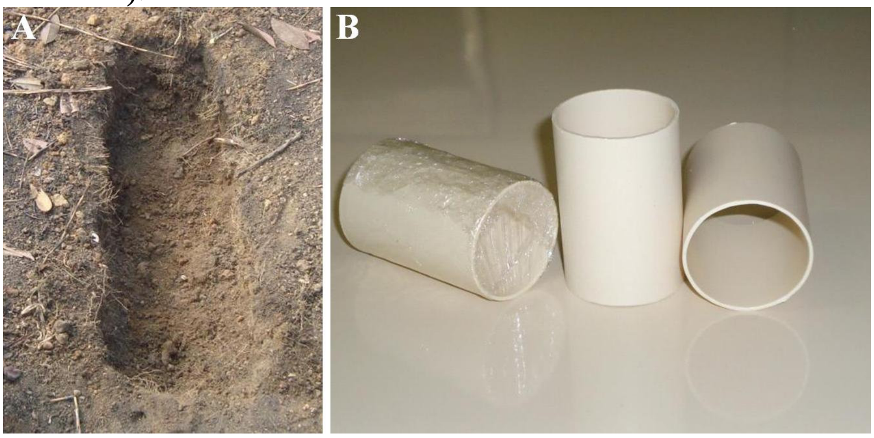
Todas as coletas foram realizadas no dia 05 de novembro de 2011, em alta temporada de estiagem (verão) amazônica[3] (MARENGO *et al.*, 2011). Os três sítios para coleta de solo da savana amapaense localizados às margens da rodovia BR 156, entre 50 a 200 m, apresentavam características bem definidas da savana nativa, com pouca ou nenhuma ação antrópica aparente, sendo dois sítios na direção sul da rodovia, e um a norte. Três sítios de coleta foram selecionados com o objetivo de aumentar as chances de isolamento de micro-organismos, dois destes sítios foram escolhidos na região Sul do Estado do Amapá, por apresentarem vegetação nativa e menos modificada pela ação humana.

De cada sítio foram selecionados dois pontos para coleta, os pontos **A** e **B**. Os primeiros pontos (pontos A) eram sempre escolhidos por seu relevo mais elevado em relação à planície da savana, entre 10 a 50 m, onde geralmente encontrava-se nos pontos mais elevados, sendo a sua vegetação mais espaçada e rasteira, com poucos arbustos retorcidos e com gramíneas recobrindo todo o solo, os quais se apresentavam geralmente compactados, arenosos e bastantes rochosos. Os segundos pontos de coleta dos sítios (pontos B) eram sempre de relevo menos elevado em relação à planície da savana (formando pequenos vales), circundados pelas elevações, onde apresentavam uma vegetação mais densa, com predominância de árvores, arbustos e palmeiras. Como a vegetação era bastante fechada e as gramíneas recobriam todo o solo, foi necessária uma limpeza prévia para ter acesso ao solo.

O método de coleta de solo utilizado foi o de escavação de trincheiras, segundo Lemos & Santos (1982). Neste método, o solo é exposto por uma limpeza prévia, e uma trincheira de

aproximadamente 70 cm de comprimento, com 20 cm de largura e 15 cm de profundidade é escavada no solo (Figura 10 A). As amostras de solo foram retiradas das paredes laterais das trincheiras, utilizando-se tubos de PVC com 10 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro, previamente assepsiados com imersão em solução aquosa de álcool etílico a 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio 2% por 6 minutos, etanol 70% por 30 segundos e, finalmente, enxágue em água destilada esterilizada (PEREIRA *et al*., 1996) (Figura 10 B).

Figura 10. A – Fotografia de uma trincheira escavada no solo da savana. B - Fotografia de tubos de PVC utilizados para coleta de solo nas trincheiras. (o tubo da esquerda está assepsiado e embalado).



Fonte: o autor.

As trincheiras foram abertas com o auxílio de uma pá para jardinagem, uma enxada e um ferro de cova, previamente desinfetados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio comercial a 30%. De cada trincheira, foram retiradas duas amostras de solo com profundidades diferentes, conforme protocolo. A primeira amostra foi retirada de uma profundidade de 0 a 5 cm, e a segunda amostra de 5 a 10 cm de profundidade.

Para compor cada uma das amostras, foram retiradas três subamostras laterais de aproximadamente 100 gramas cada (aproximadamente um tubo PVC preenchido com solo). As subamostras foram imediatamente embaladas em filme PVC e identificadas após sua coleta, e acondicionadas em cuba térmica a 4ºC. Após o término das coletas, todas as subamostras foram transportadas ao laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Amapá para serem armazenadas em freezer a –18ºC.

5.3 Isolamento das colônias microbianas

5.3.1 Diluição seriada

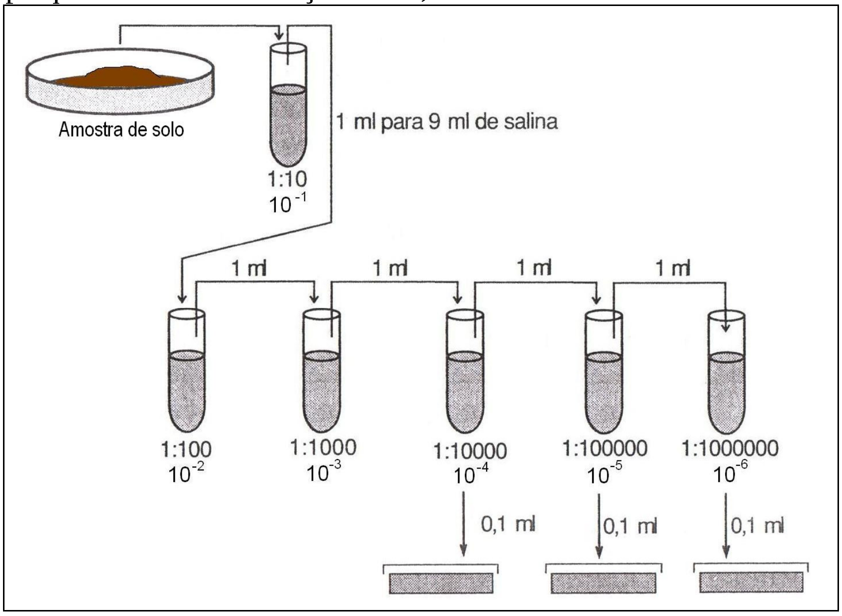
Para isolar os micro-organismos das amostras de solo, foi feita uma série de diluições em solução salina a 0,85% de NaCl, e posterior plaqueamento em placas de Petri contendo meios com ágar específicos para isolamento de micro-organismos – bacterianos e fungicos.

Em cada um dos três sítios de coleta das amostras de solo, dois pontos foram selecionados, e de cada ponto foram coletadas amostras em duas profundidades diferentes, uma de 0 a 5 cm e a outra de 5 a 10 cm de profundidade. Para compor cada uma das amostras, três subamostras (três tubos de PVC) foram coletados, com aproximadamente 100 gramas de solo cada um, conforme Pereira *et al*., (1996).

Em laboratório, foram pesadas 10 gramas de solo de cada uma das três subamostras e homogeneizadas em um erlenmeyer de 1000 mL para compor uma amostra de 30 g, de cada ponto em sua respectiva profundidade. De cada amostra homogeneizada (30 g), foram retiradas 10 g de solo, que em seguida foram suspensas em solução salina esterilizada até completar o volume de 100 mL (aproximadamente 90 mL se solução salina), e agitadas por 10 minutos em agitador rotativo a 150 rpm, formando assim a primeira diluição (diluição 10^{-1}).

Do tubo contendo a diluição 10^{-1}, foi retirado 1 mL da solução para ser diluído em 9 mL de solução salina esterilizada, e após agitação por 5 minutos, formou-se assim a diluição 10^{-2}, e assim sucessivamente foram feitas diluições seriadas de 1:10 mL com a mesma solução, até se obter diluições 1:10000 (10^{-4}), 1:100000 (10^{-5}) e 1:1000000(10^{-6}) gramas de solo por ml de solução (figura 11).

Figura 11. Desenho ilustrativo da diluição seriada e do plaqueamento das diluições 10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-6}.



Fonte: o autor.

5.3.2 Preparação dos extratos de solo

Para suprir as pequenas necessidades minerais difíceis de conseguir em meios específicos e sintéticos para crescimento microbiano preparou-se extratos estéreis dos solos para cada local de coleta, adaptado de Varma & Oelmüller, (2007) e Pramer & Schmidt, (1964), para fins de enriquecimento mineral dos meios de cultivo utilizados no isolamento de bactérias e fungos.

Para se preparar os extratos dos solos para enriquecimento mineral dos meios de crescimento, foram coletadas porções do mesmo solo para cada amostra. As porções de solo foram peneiradas a fim de separar as pedras e as partículas maiores, além de uma separação manual da matéria orgânica não decomposta, como restos de vegetais e insetos, sobrando assim, somente solo e pequenas partículas para serem diluídas em água desionizada. Dessa porção de solo peneirada e catada, 100 g foram pesadas e diluídas em água desionizada até completar o volume de 1000 mL, e posteriormente foram agitadas em agitador rotativo por 30 min a 150 rpm.

Após agitação, a mistura (água desionizada + solo) foi filtrada em papel filtro por três vezes consecutivas e decantada por 24 horas, para separação das menores partículas. O objetivo de diluir e filtrar o solo foram à obtenção de uma solução que contivesse sais minerais dissolvidos, formando um extrato se solo enriquecido, para ser utilizado na preparação dos meios utilizados no cultivo dos micro-organismos numa proporção de 20% do

conteúdo líquido. Os meios utilizados foram: Amido-Caseína Ágar (ACA), Ágar Nutriente (AN), Ágar Bennett (MAB), Ágar Luria-Bertani broth (LB) e Ágar Müeller-Hinton (MH), ágar Sabouraud dextrose (SDA), m29, m615 e Amido-Caseína Ágar acrescido de nistatina (ACA+N), adaptado de Williams & Davies, (1965). Todos os extratos de solo obtidos foram autoclavado por 15 min a 121ºC, e acondicionado em geladeira a 4 ºC (figura 12).

Figura 12. Fotografia de três extratos de solo diferentes para enriquecimento mineral de meios de cultura microbiana.



Fonte: o autor.

5.3.3 Plaqueamento

Para realizar o plaqueamento foram selecionadas as diluições 10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-6}, por terem apresentado os melhores resultados de crescimento microbiano em testes prévios. De cada diluição foi retirada uma alíquota de 100 µL e utilizando-se a técnica de espalhamento em superfície descrito por Antunes, (1995), Neder, (1992), Koneman *et al*., (2006), Korn-Wendisch & Kutzner, (1992), as alíquotas foram espalhadas sobre a superfície do meio sólido em uma placa de Petri descartável de tamanho médio com o auxílio de uma alça de Drigalski. Todas as diluições foram semeadas em triplicata e incubadas a 37ºC em estufa bacteriológica até que as colônias pudessem ser visualizadas, durante um período de 20 a 30 dias. Os actinomicetos apresentam crescimento relativamente lento, necessitando assim, de uma incubação prolongada, entre 20 a 30 dias, e para tanto, houve a necessidade de embalar as

placas com filme PVC, a fim de se evitar a desidratação dos meios.

O meio sólido selecionado para o plaqueamento das diluições foi o meio ágar seletivo para isolamento de micro-organismos de solo, o meio Amido-Caseína Ágar (ACA), segundo Küster &Williams, (1964) foi preparado com 10,0 g de amido solúvel, 0,3 g de caseína ácida hidrolisada, 2,0 g de KNO_3, 2,0 g de NaCl, 2,0 g de K_2HPO_4, 0,05 g de $MgSO_4.7H_2O$, 0,02 g de $CaCO_3$, 0,01 g de $FeSO_4.7H_2O$ e 18,0 g de ágar. Para o enriquecimento do meio, 200 mL de extrato do solo (20% do volume total) foi adicionado à solução. O volume foi completado com água destilada até 1000 mL e o pH foi ajustado de 7,0–7,2 com NaOH 1N antes de adicionar o ágar. Após a correção do pH e a adição do ágar, todos os ingredientes foram agitados por 10 minutos em agitador rotativo a 150 rpm e autoclavado a 121ºC durante 20 minutos a 1,5 atm. Foram utilizados 25 mL de meio por cada placa de Petri média.

5.3.4 Contagem de unidades formadoras de colônias

Para se testar a eficiência do meio Amido-Caseína Ágar no plaqueamento dos micro-organismos de solo, as mesmas diluições que apresentaram resultados positivos foram plaqueadas em quatro meios não seletivos para o isolamento de micro-organismos de solo, são eles: ágar Nutriente (AN), ágar Bennett (MAB), ágar Luria-Bertani broth (LB) e ágar Müeller-Hinton (MH), sendo todos estes meios enriquecidos com extratos dos solos numa proporção de 20% do volume total da solução. Os resultados quanto ao número de UFC´s foram correlacionados posteriormente.

Para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC's) foi utilizada a técnica de espalhamento em superfície das diluições segundo Antunes, (1995) a qual consiste em espalhar com uma alça de Drigalski uma alíquota de 100 µL de cada uma das diluições 10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-6} sobre a superfície da placa de Petri de tamanho médio contendo meios sólidos.

O meio ágar Nutriente (AN), foi preparado segundo Neder, (1992) com 3g de extrato de carne, 5g de peptona G e 15g de ágar. O volume foi completado com água destilada até 1000 mL e o pH foi ajustado a $6,8 \pm 0,2$ com NaOH 1N antes de adicionar o ágar. Após a correção do pH e a adição do ágar, todos os ingredientes foram agitados por 10 minutos em agitador rotativo a 150 rpm e autoclavado a 121ºC durante 20 minutos a 1,5 atm.

O meio ágar Bennett (MAB), foi preparado segundo Heck, (2007) com 2 g de Peptona, 1 g de extrato de carne, 1 g de extrato de levedura e 18 g de ágar. O volume foi completado com água destilada até 1000 mL e o pH foi ajustado a 7,0 com NaOH 1N antes de adicionar o ágar. Após a correção do pH e a adição do ágar, todos os ingredientes foram

agitados por 10 minutos em agitador rotativo a 150 rpm e autoclavado a 121ºC durante 20 minutos a 1,5 atm.

O meio ágar Luria-Bertani broth (LB), foi preparado segundo Sambrook *et al*., (1989) com 10 g de Peptona G, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio e 20 g de ágar. O volume foi completado com água destilada até 1000 mL e o pH foi ajustado a 7,0 com NaOH 1N antes de adicionar o ágar. Após a correção do pH e a adição do ágar, todos os ingredientes foram agitados por 10 minutos em agitador rotativo a 150 rpm e autoclavado a 121ºC durante 20 minutos a 1,5 atm.

O meio ágar Müeller-Hinton (MH), foi preparado segundo Küster & Williams, (1964) com 30,0 g de extrato de carne, 17,5 g de caseína hidrolisada, 1,5 g de amido e 17,0 g de ágar. O volume foi completado com água destilada até 1000 mL e o pH foi ajustado a 7,4 com NaOH 1N antes de adicionar o ágar. Após a correção do pH e a adição do ágar, todos os ingredientes foram agitados por 10 minutos em agitador rotativo a 150 rpm e autoclavado a 121ºC durante 20 minutos a 1,5 atm.

Após espalhar homogeneamente a alíquota da suspensão de solo sobre as placas, as mesmas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37ºC no escuro por 72 horas, sendo que todos os plaqueamentos foram realizados em triplicata. As placas foram todas mantidas no escuro, uma vez que, a luz inibe o crescimento de micro-organismos de solo, como os actinomicetos. Após a incubação, foi realizada a contagem total das colônias por placa, e para se chegar ao valor total das UFC´s foi utilizado o método de contagem de unidades formadoras de colônias Spread-plate (NEDER, 1992). O cálculo consiste em multiplicar o valor da média aritmética pelo valor da alíquota e dividir o total pelo valor da diluição utilizada no plaqueamento (como foi utilizada uma alíquota de 100 μL (0,1 mL) o valor a multiplicar é igual a 10). O resultado é dado em UFC por grama de solo, conforme equação abaixo.

$$\frac{\text{1ª placa} + \text{2 ª placa} + \text{3ª placa}}{3} = \text{Média de colônias por diluição.}$$

$$\frac{\text{Média de colônias por diluição x 10}}{\text{Valor da diluição}} = \text{UFC/g}$$

5.3.5 Repique em meios específicos para o crescimento de micro-organismos de solo

Todas as colônias isoladas em meio específico para isolamento de micro-organismos de solo, especialmente aquelas que apresentaram características morfológicas observáveis macroscopicamente típicas de actinomicetos foram repicadas em placas com seis meios seletivos (meio ágar Bennett (MAB), ágar Sabouraud dextrose (SDA), ágar m29, ágar m615, ágar Luria-Bertani broth (LB) e Amido-Caseína Ágar acrescido de nistatina (ACA+N)) com o auxílio de uma alça bacteriológica. As colônias de actinomicetos apresentam de 1 a 10 mm de diâmetro, e com aparência inicial relativamente macia e sem brilho, passando, depois do desenvolvimento do micélio aéreo, a apresentar um aspecto bastante denso e granuloso, pulverulento, flóculoso e/ou aveludado, e coloração que varia do amarelo ao cinza-claro (figura 14).

Figura 13. Fotografias diversas de colônias de actinomicetos.



Fonte: Koneman et al., (2006).

Cada colônia isolada foi repicada em triplicata nos seis meios sólidos diferentes (ACA, AN, MAB, LB, MH, SDA, m29, m615 e ACA+N). Estes meios foram selecionados por terem apresentado bons resultados para o crescimento de micro-organismos de solo (UJIKAWA, 1995).

O meio ágar Sabouraud dextrose (SDA), foi preparado segundo a Pharmacopeia brasileira (2002), com 40,0g de dextrose, 10,0g de peptona micológica e 15,0g de ágar. O volume foi completado com água destilada até 1000 mL e o pH foi ajustado a 6,8 com NaOH

1N antes de adicionar o ágar. Após a correção do pH e a adição do ágar, todos os ingredientes foram agitados por 10 minutos em agitador rotativo a 150 rpm e autoclavado a 121ºC durante 20 minutos a 1,5 atm.

O meio ágar m29 foi preparado segundo Ujikawa, (1995), com 5,0 g de extrato de levedura, 2,0 g de extrato de carne, 3,0 g de peptona G, 10,0 g de dextrose, 1,0 g de carbonato de cálcio e 15 g de ágar. O volume foi completado com água destilada até 1000 mL e o pH foi ajustado a 7,0 com NaOH 1N antes de adicionar o ágar. Após a correção do pH e a adição do ágar, todos os ingredientes foram agitados por 10 minutos em agitador rotativo a 150 rpm e autoclavado a 121ºC durante 20 minutos a 1,5 atm.

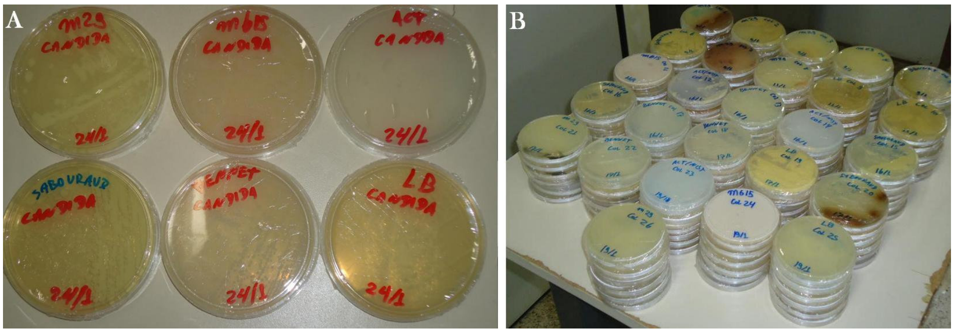
O meio m615 foi preparado segundo Ujikawa, (1995), com 50,0g de dextrose, 332,0 mL de leite de soja, 10,0 g de carbonato de cálcio, 15,0 g de ágar e 668,0 mL de água destilada. O pH foi ajustado a 7,0 com NaOH 1N antes de adicionar o ágar. Após a correção do pH e a adição do ágar, todos os ingredientes foram agitados por 10 minutos em agitador rotativo a 150 rpm e autoclavado a 121ºC durante 20 minutos a 1,5 atm.

O meio seletivo para isolamento de actinomicetos acrescido de nistatina, foi adaptado de Küster & Williams, (1964) e Williams & Davies, (1965), e foi preparado com 10,0 g de amido solúvel, 0,3 g de caseína ácida hidrolisada, 2,0 g de KNO_3, 2,0 g de NaCl, 2,0 g de K_2HPO_4, 0,05 g de $MgSO_4.7H_2O$, 0,02 g de $CaCO_3$, 0,01 g de $FeSO_4.7H_2O$ e 18,0 g de ágar. O volume foi completado com água destilada até 1000 mL e o pH foi ajustado de 7,0–7,2 com NaOH 1N antes de adicionar o ágar. Após a correção do pH e a adição do ágar, todos os ingredientes foram agitados por 10 minutos em agitador rotativo a 150 rpm e autoclavado a 121ºC durante 20 minutos a 1,5 atm. Após ser retirado da autoclave, esperou-se o meio resfriar a aproximadamente 50ºC, e adicionava-se nistatina líquida (um antimicótico) a solução numa concentração de 500 UI/mL de meio. O meio então era agitado por 3 minutos em agitador rotativo a 150 rpm e antes de resfriar totalmente eram distribuídos em 25 mL de meio por cada placa de Petri média. Os meio ágar Bennett (MAB) e o meio Luria-Bertani broth (LB) já foram descritos anteriormente.

O repique dos isolados em seis meios específicos para crescimento de micro-organismos de solo teve por finalidade testar em quais meios os isolados apresentavam melhor crescimento. Para cada isolado, foram selecionados os três meios sólidos que apresentaram melhor crescimento para a realização dos ensaios de antibiose contra os micro-organismos-alvo (grupo controle). Os quatros micro-organismos, pertencentes a linhagens-controle ATCC (*Candida albicans*, *Staphilococos aureus*, *Pseudomonas aeruginosa e Mycobacterium smegmatis*) também foram testados nos seis tipos de meios de culturas

sólidas, a fim de se verificar o melhor meio para o crescimento e, assim, com os resultados de crescimento de todos os micro-organismos (isolados e controle), selecionou-se os melhores meios para ambas às culturas (Figura 15).

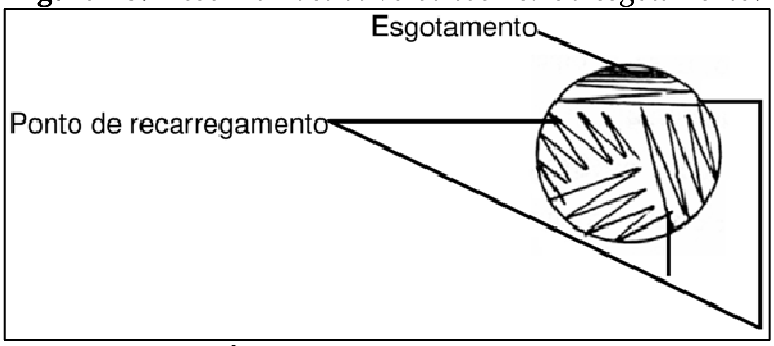
Figura 14. A – Isolamento de *Candida Albicans* em seis meios sólidos diferentes. B – Plaqueamento das amostras de solo com crescimento de isolados microbianos.



Fonte: o autor.

As colônias ATCC foram repicadas em triplicata nos seis meios seletivos por meio da técnica de esgotamento segundo Antunes, (1995) com o auxílio de uma alça bacteriológica e incubada em estufa bacteriológica a 37ºC por 72 horas (figura 16).

Figura 15. Desenho ilustrativo da técnica do esgotamento.



Fonte: Monteiro *et al*, 2009.

5.4 Caracterização e identificação morfológica dos micro-organismos

5.4.1 Coloração de Gram

Após o período de incubação das placas repicadas contendo os isolados, foram selecionadas colônias aparentemente puras as quais foram submetidas à coloração de Gram descrito por Koneman *et al*., (2006) - modificado. Este procedimento serviu para verificar a pureza das culturas dos isolados, e para análise da morfologia microscópica dos micro-

organismos.

No procedimento de coloração de Gram, primeiramente, foi feito um esfregaço fino de cada amostra em uma lâmina de microscopia, e estas foram secas ao ar, e posteriormente, os esfregaços foram fixados passando as lâminas na chama do bico de Bunsen, depois o esfregaço foi colocado em um suporte para coloração. A coloração consistiu em se cobrir os esfregaços com solução de cristal violeta durante 60 segundos; em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada e cobriu-se com solução de lugol – iodo por um minuto, e lavadas novamente em água destilada; em seguida os esfregaços foram descorados com acetona-álcool até o completo desaparecimento da cor violeta e em seguida lavados em água destilada. Os esfregaços foram cobertos com o contracorante Safranina por 30 segundos, e lavados em seguida com água destilada e colocados em posição vertical para que secassem. Depois de secos, os esfregaços corados foram examinados ao microscópio óptico com objetiva de imersão (100x), utilizando uma gota de óleo de imersão. Na observação, os micro-organismos bacterianos Gram-positivos coram-se de azul-escuro, enquanto os Gram-negativos coram-se de rosa-vermelho, enquanto isso, os micro-organismos micóticos (fungos e levedos) têm suas paredes coradas de roxo.

5.4.2 Caracterização macroscópica das colônias isoladas

A seleção dos micro-organismos isolados do solo da savana, em diferentes condições ambientais, foi feita com base nas diferenças das características morfológicas, observadas a olho desarmado, que as colônias isoladas no plaqueamento e nos repiques em seis meios de cultura sólidas específicas para crescimento de micro-organismos de solo (ágar Bennett, Sabouraud dextrose, seletivo para isolamento de micro-organismos de solo, m29, m615 e LB) apresentaram em placas de Petri, descrito por Waksman, (1961).

5.4.3 Caracterização microscópica dos isolados

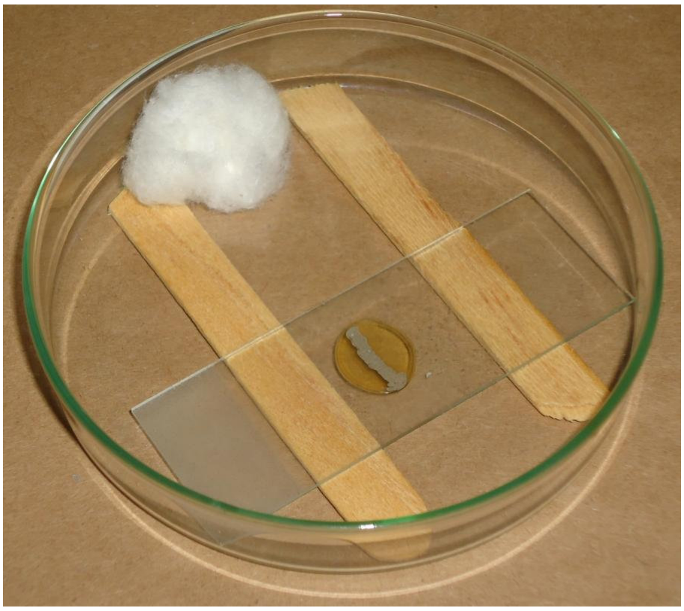
A caracterização da morfologia microscópica dos micro-organismos isolados das amostras de solo baseou-se na análise ao microscópico óptico do esfregaço dos micro-organismos isolados e repicados em uma lâmina de microscopia. O cultivo dos isolados em uma lâmina de microscopia foi realizado através da *técnica do microcultivo*.

Após a coloração de Gram, foram realizados microcultivos conforme descrito por Williams *et al*., (1989) e Holt *et al*., (1989) - adaptado. Essa técnica possibilitou a observação

do micélio aéreo e das estruturas reprodutivas, quando presentes, e do micélio sobre o substrato de todas as amostras, permitindo assim, uma observação das características morfológicas, e com isso, cruzando os resultados obtidos da coloração de Gram, foi possível diferenciar os actinomicetos das leveduras.

Para o microcultivo foram montadas placas de Petri contendo em seu interior dois palitos, sobre os quais foi depositada uma lâmina de microscopia, e ao lado, um pedaço de algodão de aproximadamente 2 cm^3 (figura17). Cada conjunto foi embalado e autoclavado à 121ºC durante 20 minutos a 1,5 atm. Após a esterilização, com o auxílio de uma pinça esterilizada, foi adicionado sobre cada lâmina um disco de meio solidificado com diâmetro de 1 cm (aproximadamente 700 mg de meio sólido), recortado previamente com o auxílio de um tubo de ensaio esterilizado. Após o preparo da placa de microcultivo, uma alíquota do isolado foi semeada com o auxílio de um palito de madeira estéril, num risco transversal à lâmina, e posteriormente foi adicionado 1 mL de água deionizada estéril sobre o algodão. As placas foram fechadas e incubadas em uma estufa a 37ºC por um período aproximado de 3 a 10 dias, dependendo do crescimento, ou até que o micélio estivesse bem desenvolvido. Durante o período de incubação, foram feitas observações periódicas das características como: ramificação do micélio sobre o substrato, formação do micélio aéreo, fragmentação e produção de esporos. Estas observações eram realizadas em microscópio óptico com um aumento de 400x.

Figura 16. Fotografia do microcultivo de um actinomiceto.



Fonte: o autor.

5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

5.5.1 Preparação dos micro-organismos-controle para avaliação da atividade inibitória

Micro-organismos-controle para testes da atividade inibitória (bactéria Gram-positivo, Gram-negativo, levedura e bacilo álcool-ácido resistente – BAAR (micobactéria)) foram semeados separadamente em seis meios de ágar sólidos diferentes (Bennett, Sabouraud dextrose, seletivo para isolamento de micro-organismos de solo, m29, m615 e LB), para que fosse possível analisar o crescimento nesses diferentes meios. Com os resultados cruzados de crescimento dos micro-organismos-controle e dos micro-organismos isolados do solo em diferentes meios sólidos, foi possível selecionar três meios que apresentaram os melhores resultados de crescimento em todas as culturas, e nesses meios selecionados foram realizados os ensaios de antibiose.

As linhagens-controle padronizadas ATCC de bactérias e um fungo leveduriforme utilizados como linhagens-controle neste trabalho foram cedidas pelo Laboratório de Tecnologias do DNA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM (Quadro 01).

Quadro 01 – micro-organismo-controle para ensaios de antibiose.

Micro-organismos	Linhagem (Cepa)
Bactéria Gram-positivo	
Staphylococcus aureus	(ATCC 25923)
Bactéria Gram-negativo	
Pseudomonas aeruginosa	(ATCC 27853)
Bacilo álcool-ácido resistente (BAAR)	
Mycobacterium smegmatis	(ATCC 14468)
Levedura	
Candida albicans	(ATCC 10231)

Fonte: Laboratório de Tecnologias do DNA, Universidade Federal do Amazonas.

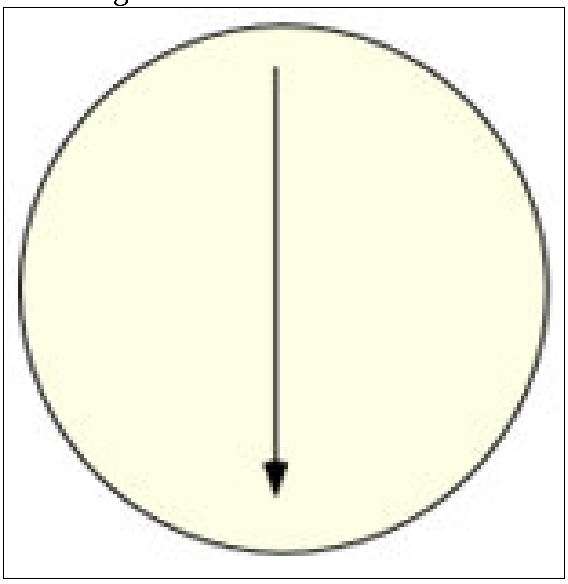
5.5.2 Inoculação dos micro-organismos a serem testados

Comparando os resultados de crescimento microbiano dos micro-organismos isolados das amostras do solo com os resultados de crescimento dos micro-organismos-controle em

diferentes meios, pode-se assim, selecionar dos seis meios sólidos testados, os três que melhor apresentaram crescimentos nas cinco culturas diferentes para os ensaios de antibiose.

Todos os isolados microbianos dos solos foram testados para inibição de micro-organismos, e para isso, de cada micro-organismo isolado, uma colônia pura foi selecionada, e dela com o auxílio de um swab uma amostra foi retirada, e com este swab foi feito um traço central em uma placa de Petri contendo o meio sólido selecionado para o melhor crescimento (Figura 18). Cada isolado foi inoculado em triplicata em três meios diferentes e incubado em estufa bacteriológica por 7 a 10 dias a 37ºC, dependendo do crescimento, para que pudessem produzir metabolitos secundários com possível ação antimicrobiana.

Figura 17. Desenho ilustrativo demostrando o sentido de inoculação do micro-organismo a ser testado.

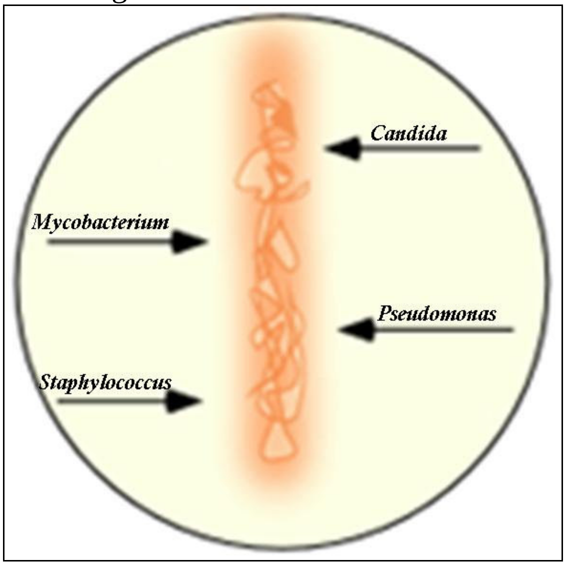


Fonte: O autor.

5.5.3 Inoculação dos micro-organismos-controle

Após o crescimento satisfatório dos micro-organismos isolados das amostras de solo, quatro micro-organismos-controle para os ensaios de antibiose foram inoculados nas mesmas placas de Petri, em traços perpendiculares ao traço central com o auxílio de palitos estéreis (teste do Cris-Cross) (figura 19). Foram inoculados os micro-organismos-controle para os ensaios de antibiose em traços perpendiculares ao traço central sempre obedecendo a seguinte ordem: *Candida albicans* (levedura), *Mycobacterium smegmatis* (Bacilo Álcool-Ácido resistente – BAAR), *Pseudomonas aeruginosa* (bactérias Gram-negativo) *e Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positivo).

Figura 18. Desenho ilustrativo demostrando o sentido de inoculação dos micro-organismo-controle.



Fonte: O autor.

Depois da inoculação de todos os micro-organismos, as placas foram embaladas em filme PVC e mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 72 a 96 horas, dependendo do crescimento. Após o período de incubação, foram feitas as leituras da inibição, medindo-se em mm a distância entre os micro-organismos testados para antibiose e os micro-organismos-controle. Cada procedimento foi realizado em triplicata.

6 RESULTADO E DISCUSSÃO

6.1 Isolamento das colônias microbianas

Cada diluição (10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-6}), das doze amostras de solo foram plaqueadas em triplicatas, através da técnica de espalhamento em superfície, em meio Amido-Caseína Ágar (ACA), o que totalizou 108 placas. O meio ACA mostrou-se bastante adequado para o isolamento de micro-organismos de solo, principalmente actinomicetos, visto que este meio favoreceu o crescimento de actinomicetos e alguns fungos em detrimento dos demais micro-organismos. Das diluições que apresentaram crescimento de colônias nas placas, estas mesmas diluições foram plaqueadas em triplicata em quatro meios não específicos para crescimento de micro-organismos de solo para fins de comparações na contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC´s).

Na preparação dos meios ACA, 20% do volume líquido foram compostos por extratos de solo enriquecidos com os minerais obtidos da mesma amostra de solo que foi utilizada na preparação das diluições para o plaqueamento (PRAMER & SCHMIDT, 1964), o objetivo desse método foi suprir pequenas exigências minerais dos micro-organismos do solo.

O meio ACA possui em sua composição caseína ácida hidrolisada, o que já torna este meio ácido, e com o acréscimo dos extratos de solo enriquecidos com minerais nos meios ACA, fez com que o pH baixasse significativamente, havendo a necessidade de correção com NaOH 1N, isto porque, segundo McCarthy & Willians, (1992) os actinomicetos (e outros micro-organismos de solo) apresentam melhor crescimento em pH neutro a alcalino. O acréscimo de minerais dos extratos de solo e o volume significativo de NaOH utilizado para correção do pH deixou o meio levemente hipertônico, o que inibia o crescimento de alguns micro-organismos mais sensíveis. Tal problema foi resolvido diminuindo de 2,0 g para 1,0 g a quantidade de NaCl do meio.

Algumas placas apresentaram mais de uma colônia aparentando ser da mesma espécie de micro-organismo, assim como placas diferentes de uma mesma diluição (da mesma amostra) apresentaram colônias aparentando ser o mesmo micro-organismo (com mesmas características macroscópicas e microscópicas), então estas colônias, foram consideradas como sendo um único micro-organismo isolado, sendo selecionada para o repique, aquela colônia que melhor estava isolada e apresentava-se pura.

Colônias que apresentavam características macromorfológicas semelhantes foram analisadas pela microscopia óptica após a coloração de Gram, e pela análise do micélio pela

observação microscópica do microcultivo, para que fosse isolado apenas um representante de cada micro-organismo, sendo assim, restaram quarenta micro-organismos diferentes entre si (tabela 01).

Tabela 01 – Numero de isolados obtidos e números de Unidades Formadoras de Colônias (UFC´s) em meio Amido-Caseína Ágar (ACA), correspondentes às respectivas amostras.

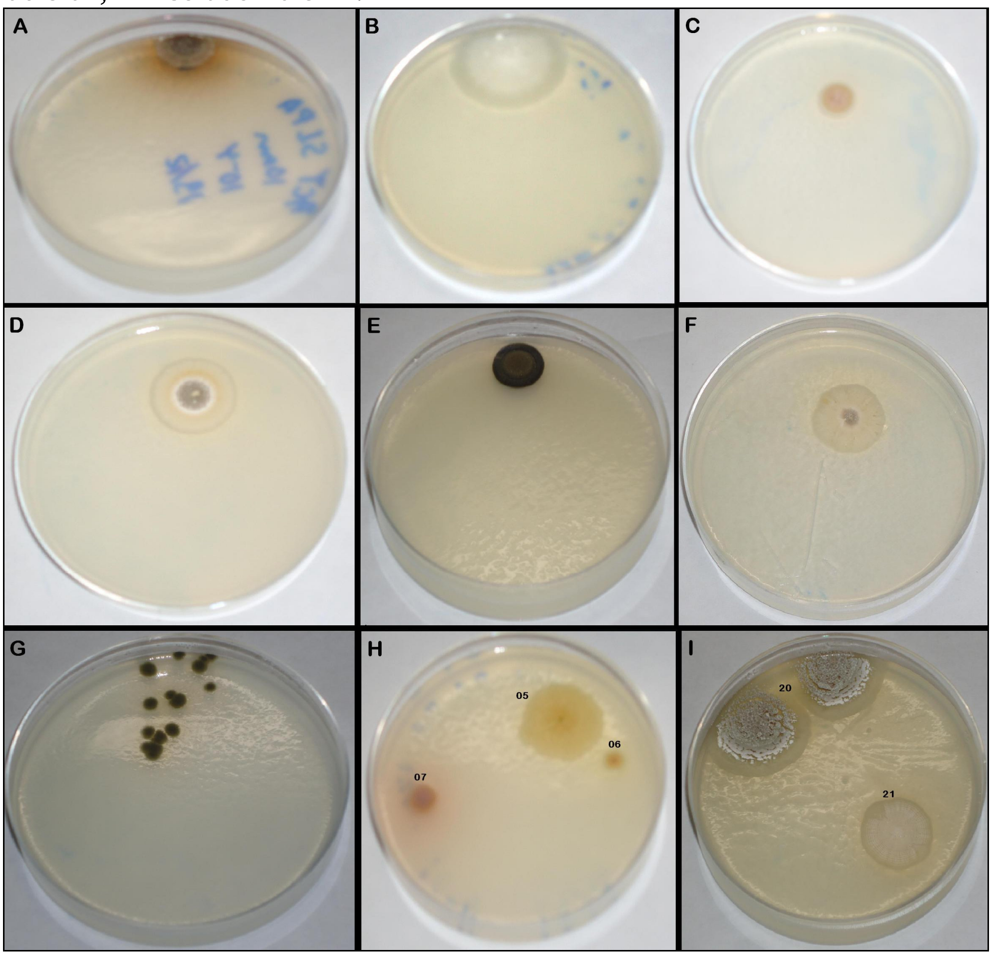
Local da Coleta		Profundidade	Diluição	Nº de isolados obtidos	Nº de Log de UFC em meio ACA
Sítio 1	Ponto 1A	0 a 5 cm	10^{-4}	1	100000
			10^{-5}	2	2000000
			10^{-6}	1	10000000
		5 a 10 cm	10^{-4}	4	333333
			10^{-5}	-	0
			10^{-6}	1	10000000
	Ponto 1B	0 a 5 cm	10^{-4}	4	233333
			10^{-5}	2	2000000
			10^{-6}	2	23333333
		5 a 10 cm	10^{-4}	2	200000
			10^{-5}	-	0
			10^{-6}	4	40000000
Sítio 2	Ponto 2A	0 a 5 cm	10^{-4}	-	0
			10^{-5}	2	2000000
			10^{-6}	-	0
		5 a 10 cm	10^{-4}	2	200000
			10^{-5}	1	1000000
			10^{-6}	-	0
	Ponto 2B	0 a 5 cm	10^{-4}	1	100000
			10^{-5}	-	0
			10^{-6}	3	30000000
		5 a 10 cm	10^{-4}	2	200000
			10^{-5}	1	1000000
			10^{-6}	1	10000000
Sítio 3	Ponto 3A	0 a 5 cm	10^{-4}	-	0
			10^{-5}	-	0
			10^{-6}	-	0
		5 a 10 cm	10^{-4}	1	100000
			10^{-5}	-	0
			10^{-6}	-	0
	Ponto 3B	0 a 5 cm	10^{-4}	2	200000
			10^{-5}	-	0
			10^{-6}	-	0
		5 a 10 cm	10^{-4}	-	0
			10^{-5}	-	0
			10^{-6}	1	10000000
Total de isolados				**40**	

Fonte: o autor.

Os quarentas micro-organismos isolados foram nomeados de “*isolados*” numerados de *1* a *40*, de acordo com a ordem cronológica de crescimento em estufa. Os primeiros micro-

organismos, isolados 1 a 18, tiveram bom crescimento em 20 dias em estufa bacteriológica à 37ºC, os isolados 19 a 25 apresentaram crescimento significativo de 21 a 30 dias, e os isolados 26 a 40, apresentaram crescimento visível após 31 dias em estufa (figura 20).

Figura 19. Fotografias dos micro-organismos de solo isolados em meio Amido-Caseína Ágar. **A** – isolado 01; **B** – isolado 03; **C** – isolado 08; **D** – isolado 09; **E** – isolado 17; **F** – isolado 18; **G** – isolado 22; **H** – isolado 05, 06 e 07; **I** – isolado 20 e 21.



Fonte: o autor.

Havendo três sítios, e de cada sítio foram selecionados dois pontos de coletas, e de cada ponto, duas amostras foram retiradas em duas profundidades diferentes (0 a 5 cm e 5 a 10 cm), e de cada amostra, em sua respectiva profundidade, foram plaqueadas três diluições diferentes (10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-6}), o que totalizou 36 diluições plaqueadas em meio ACA (tabela 01). Das 36 diluições plaqueadas, apenas 21 (58,33%) apresentaram crescimento microbiano (colônias isoladas) e 15 diluições (41,67%) não apresentaram crescimento microbiano em até 40 dias de encubação em estufa bacteriológica a 37ºC. Os resultados comprovam a eficácia do meio ACA como seletivo para o crescimento de micro-organismos de solo, como também

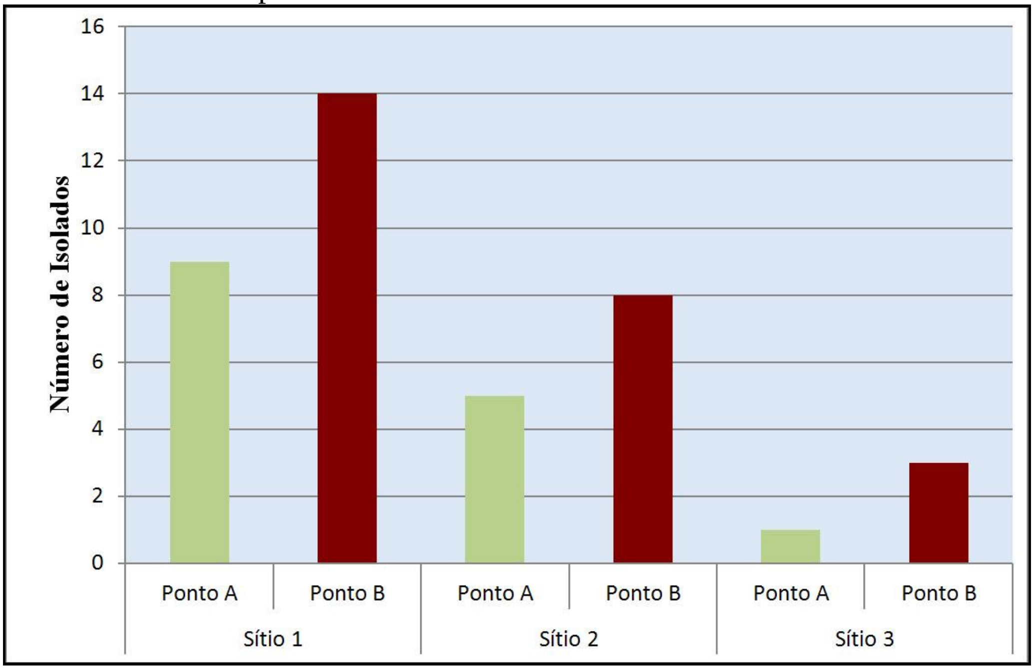
verificado por Oliveira, (2003).

Dos 40 micro-organismos isolados, 19 (47,5%) foram isolados das diluições 10^{-4}, 8 (20%) das diluições 10^{-5} e 13 (32,5%) das diluições 10^{-6}. Plaqueamentos realizados com diluições acima de 10^{-6} em ensaios prévios (diluições 10^{-7} e 10^{-8}), não apresentaram resultados significativos, levando-as assim, a serem descartadas nos posteriores plaqueamentos. Nos plaqueamentos realizados com diluições menores que 10^{-4} (10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}), estes apresentavam um número muito grande de colônias por placa, tornando difícil (ou mesmo inviável) o isolamento e a contagem de UFC´s.

O sítio 1 de coleta de solo foi responsável por 23 dos 40 micro-organismos isolados (57,5%), o sítio 2 por 13 isolados (32,5%) e o sítio 3 por 4 isolados (10%). Os sítios 1 e 2 ficam localizados na porção sul da BR 156 do estado do Amapá. Este trecho desta rodovia não é pavimentado, o que dificulta o acesso à região sul deste Estado, fazendo com que a savana desta região seja pouco utilizada na agricultura e pecuária, assim como quase não há nesta região empreendimentos industriais, e a densidade populacional rural é visivelmente menor em relação à região norte da rodovia, e possivelmente por estes motivos, que juntos, os sítios 1 e 2 representam 90% dos micro-organismos isolados (36 isolados).

O trecho norte da rodovia, onde se localiza o sítio 3, é pavimentado e com trânsito bastante movimentado, principalmente por caminhões de carga, oriundos dos empreendimentos industriais localizados próximos ao local de coleta, quanto no escoamento de produtos agrícolas, especialmente da agricultura familiar. A agricultura, mesmo a familiar, utiliza-se de pesticidas em suas plantações, além do plantio de pastagens para animais de rebanho. O índice populacional rural as margens da rodovia é consideravelmente maior no trecho norte da BR 156, e é perceptível a presença de indícios de queimadas ao longo desta rodovia, tanto queimadas acidentais quanto queimadas provocadas, e possivelmente, por estes e outros motivos, como diferenças no pH do solo e na quantidade de água, que o sítio 3 foi responsável por 4 dos 40 micro-organismos isolados (apenas 10% do total). Pelos resultados observados, pode-se notar uma diferença na composição da microbiota do solo entre os diferentes sítios de coleta da savana amapaense (figura 21), o que traz a tona à necessidade de uma pesquisa minuciosa que possa apresentar as possíveis causas de tal divergência na microbiota, seja ela, uma característica natural, ou por ação antrópica.

Figura 20. Gráfico representando o número de isolados microbianos por ponto de coleta no seu respectivo sítio.



Fonte: o autor.

O sítio 1 apresentou 23 micro-organismos isolados, destes, 9 (39,13%) foram isolados no ponto A e 14 (60,87%) no ponto B. O sítio 2 apresentou 13 micro-organismos isolados, destes, 5 (38,46%) foram isolados no ponto A e 8 (61,54%) no ponto B. O sítio 3 apresentou 4 micro-organismos isolados, destes, 1 (25%) foi isolado no ponto A e 3 (75%) no ponto B. Dos 40 micro-organismos isolados, 15 foram isolados nos pontos A (37,5%), e 25 micro-organismos foram isolados nos pontos B (62,5%). O número de micro-organismos isolados de solos nas diferentes condições variou muito, como era de se esperar, pois as características físico-químicas e microbiológicas dos solos geralmente são distintas (LACEY, 1973).

Os resultados demostram uma predominância de micro-organismos de solo da savana em relevos menos elevados, possivelmente isto se dá porque, nas elevações, o solo além de mais compactado e rochoso, é bem menos úmido em relação aos vales, que apresentam menos pedregulhos, geralmente são arenosos e menos compactos, são encharcados ou úmidos, o microclima bem mais ameno e favorável, e por apresentarem vegetação mais fechada, o que deixam o solo dos vales menos exposto diretamente à radiação solar, que é extremamente nociva a microbiota, além de, diminuir a oscilação de temperatura do solo. Nas elevações, como o solo fica mais exposto diretamente à radiação solar, e por ser composto por muitos pedregulhos de coloração escura, há uma oscilação considerável na temperatura do solo, o que acaba desnaturando as proteínas dos micro-organismos, diminuindo assim, sua capacidade metabólica celular, ou até mesmo, causando sua morte.

A região amazônica possui um elevado índice pluviométrico, e na savana amapaense não é diferente. O elevado volume de chuvas, principalmente no “inverno amazônico”, provoca um fenômeno natural de lixiviação dos nutrientes e minerais das elevações da savana, que são carreados normalmente para os igarapés, rios e lagos. Em algumas situações, as águas pluviais escoam os nutrientes para depressões do relevo, permanecendo empoçada nesses vales, tornando o solo dessas depressões relativamente mais ricas nesses microambientes, em relação às demais as porções mais elevadas do solo.

O resultado de micro-organismos isolados do solo, levando-se em consideração a variável profundidade da amostra, apresentou-se irrelevantes, pois exatamente 20 micro-organismos (50%) foram isolados em cada profundidade diferente, confirmando-se com a observação de Iwai & Takahashi, (1992) que “80% dos actinomicetos (e outros micro-organismos) do solo ocorrem na camada mais superficial do solo (0–10 cm), diminuindo progressivamente com a profundidade”.

Souza *et al*. (2008) e Ratti, (2010), isolaram micro-organismos do solo do cerrado brasileiro, estes foram identificados e novas espécie que foram descritas. Os resultados obtidos por estes autores colaboram com os resultados obtidos no presente trabalho, mostrando que o bioma savana (cerrado) possui uma variedade de microrganismos com aplicação biotecnológica.

6.2 Repique em meios específicos para o crescimento de micro-organismos de solo

Os quarenta micro-organismos isolados e os micro-organismos-controle para ensaios de antibiose foram repicados em seis meios de cultura diferentes, meio ágar Bennett (MAB), ágar Sabouraud dextrose (SDA), ágar m29, ágar m615, ágar Luria-Bertani broth (LB) e Ágar acrescido de nistatina (ACA+N). Após o repique, as culturas foram analisadas depois de mantidas em estufa bacteriológica por 72 a 96 horas a 37°C. Os repiques nos meios específicos para crescimento de micro-organismos de solo serviram para se analisar em quais meios os isolados apresentavam melhor crescimento, e cruzando os resultados de crescimento microbiano dos micro-organismos isolados e dos micro-organismos-controle para ensaios de antibiose, pode-se assim, selecionar os três melhores meios para realização dos ensaios de antibiose em placa pelo método do traço cruzado (Cris-Cross) (Tabela 02, 03 e Figura 22).

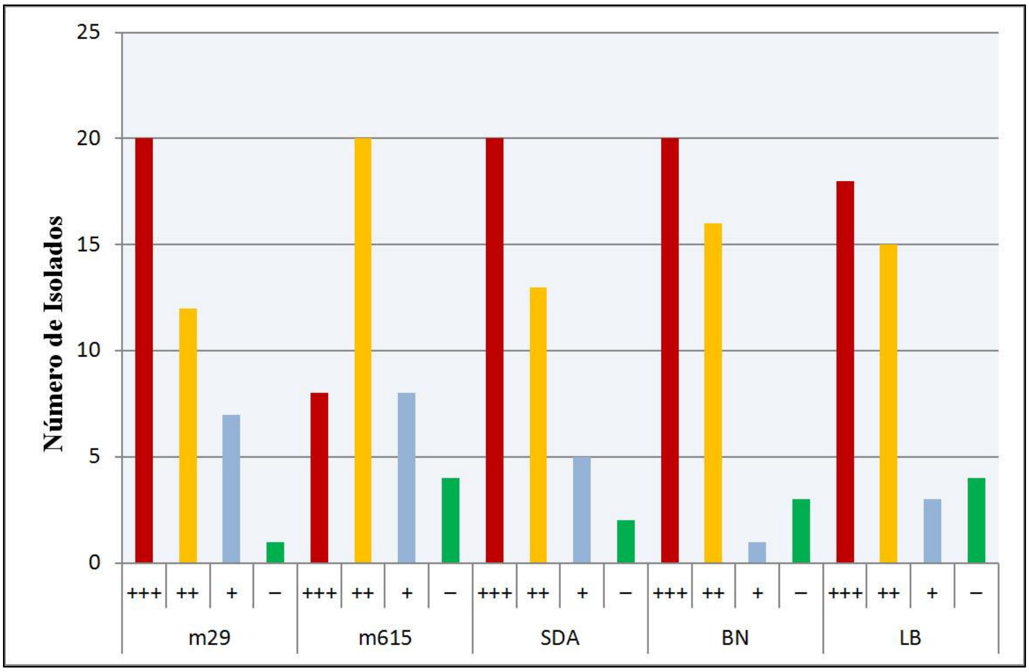
Tabela 02 – Resultado do crescimento microbiano dos micro-organismos isolados do solo em meios específicos para o crescimento de micro-organismos de solo.

Isolados	**Meios sólidos de Ágar**					
	m29	**m615**	**ACA+N***	**SDA**	MAB	**LB**
01	++	++	+++	++	+++	+++
02	+++	++	+	+	–	+++
03	+++	++	–	+	+++	++
04	+++	++	–	++	++	++
05	++	+	++	++	+++	–
06	+++	+++	+++	+++	+++	+++
07	+++	++	+	+++	+++	+++
08	++	++	++	++	++	++
09	+++	+++	++	++	+++	+++
10	+++	++	+	+++	+++	+++
11	+++	+++	+++	++	++	++
12	+++	++	+++	+++	++	+++
13	–	+	–	–	–	–
14	++	++	++	++	++	++
15	+++	-	+	++	++	-
16	++	+	+	+	++	+
17	+	+	–	–	–	+
18	+++	–	++	+++	+++	+++
19	+++	+++	+++	+++	+++	+++
20	++	++	++	++	++	++
21	++	+	–	+	++	++
22	+++	+++	+++	+++	+++	+++
23	++	+	+	++	++	+
24	+	–	–	+	+	–
25	+++	–	–	+++	+++	+++
26	+++	+++	–	+++	+++	+++
27	+	++	–	+++	++	++
28	+++	++	–	+++	+++	++
29	++	++	–	++	++	++
30	+	++	–	+++	++	++
31	++	+	–	++	+++	+++
32	++	++	–	+++	+++	+++
33	+	++	–	++	+++	++
34	++	+	–	+++	++	+++
35	+++	+++	–	+++	+++	++
36	+	++	–	+++	++	++
37	+++	+++	+++	+++	+++	+++
38	+	++	–	+++	++	++
39	+++	++	+++	+++	+++	+++
40	+++	++	++	+++	+++	+++

* Meio Amido-Caseína Ágar acrescido de nistatina. Fonte: o autor.

Excelente crescimento: **+++** (Colônias grandes: ≥ 5 mm)
Bom Crescimento: **++** (Colônias médias: < 5 mm e ≥ 2 mm)
Pouco Crescimento: **+** (Colônias pequenas: < 2 mm > 0 mm)
Nenhum crescimento: **–** (Colônias: 0 mm)

Figura 21. Gráfico apresentando o crescimento dos micro-organismos isolados em cinco diferentes meios de culturas.



Excelente crescimento:	+++ (Colônias grandes: ≥ 5 mm)	Fonte: o autor.
Bom Crescimento:	++ (Colônias médias: < 5 mm e ≥ 2 mm)	
Pouco Crescimento:	+ (Colônias pequenas: < 2 mm > 0 mm)	
Nenhum crescimento:	– (Colônias: 0 mm)	

Os resultados quanto ao crescimento de micro-organismos isolados do solo nos cinco diferentes meios sólidos, de modo geral, apresentaram bons resultados de crescimento. No meio m29, 32 isolados (80%) apresentaram excelente crescimento (+++) ou bom crescimento (++); no meio m615, 28 isolados (70%) apresentaram excelente ou bom crescimento; no meio SDA, 33 isolados (82,5%) apresentaram excelente ou bom crescimento; no meio MAB, 36 isolados (90%) apresentaram excelente ou bom crescimento e no meio LB, 33 isolados (82,5%) apresentaram excelente ou bom crescimento.

Tabela 03 – Crescimento microbiano dos micro-organismos-controle para ensaios de antibiose em meios específicos para o crescimento de micro-organismos de solo.

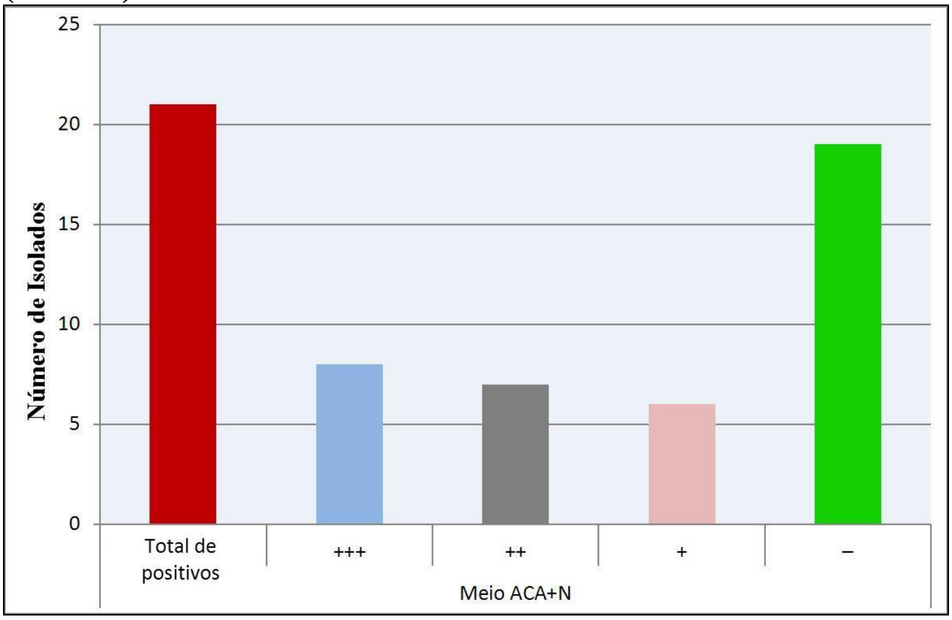
Microganismos	**Meios sólidos de Ágar**				
	M29	**M615**	**SDA**	**MAB**	**LB**
Staphylococcus aureus	+++	++	+++	+++	+++
Candida albicans	+++	+++	+++	+++	++
Mycobacterium smegmatis	+++	+++	+++	+++	+++
Pseudomonas aeruginosa	+	–	–	++	++

Excelente crescimento:	+++ (Colônias grandes: ≥ 5 mm)	Fonte: o autor.
Bom Crescimento:	++ (Colônias médias: < 5 mm e ≥ 2 mm)	
Pouco Crescimento:	+ (Colônias pequenas: < 2 mm > 0 mm)	
Nenhum crescimento:	– (Colônias: 0 mm)	

Com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*, que somente apresentou bom crescimento nos meios MAB e LB, todos os outros micro-organismos-controle para ensaios de antibiose (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Mycobacterium smegmatis*) apresentaram crescimento de bom a excelente em todos os cinco meios de cultura (m29, m615, SDA, MAB e LB).

Os micro-organismos isolados do solo também foram repicados em meio Amido-Caseína Ágar acrescido de nistatina (ACA+N). O meio ACA é específico para isolamento de micro-organismos de solo, sua composição é rica em minerais comumente encontrados no solo, o que inibe o crescimento de alguns micro-organismo não típicos do solo, e a nistatina por ser um antifúngico, acrescida ao meio inibe o crescimento da maioria dos fungos e algumas leveduras (Figura 23).

Figura 22. Gráfico demonstrando o crescimento dos isolados microbianos em meio Amido-Caseína Ágar acrescido de nistatina (ACA+N).



Excelente crescimento: +++ (Colônias grandes: ≥ 5 mm) Fonte: o autor.
Bom Crescimento: ++ (Colônias médias: < 5 mm e ≥ 2 mm)
Pouco Crescimento: + (Colônias pequenas: < 2 mm > 0 mm)
Nenhum crescimento: – (Colônias: 0 mm)

Com os resultados dos crescimentos microbianos dos micro-organismos isolados do solo e dos micro-organismos-controle para ensaios de antibiose nos diferentes meios selecionados para crescimento de micro-organismos de solo (m29,m615, SDA, MAB e LB), pode-se então, selecionar os meios que apresentaram os melhores crescimentos nos micro-organismos-controle, quando nos micro-organismos isolados a serem testados para antibiose

(tabela 03 e 04 e figura 24).

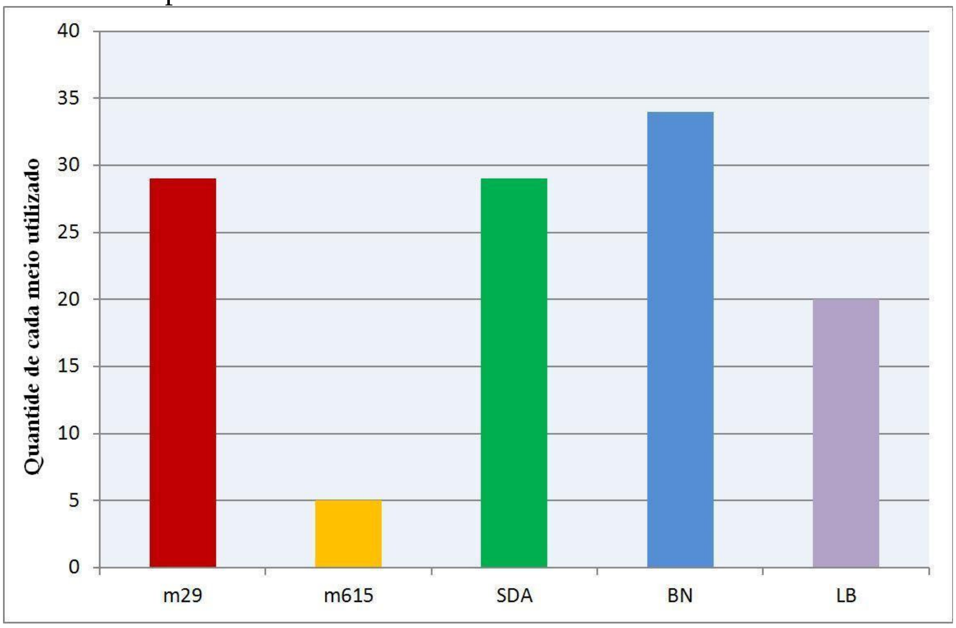
Tabela 04 – Meios de cultura selecionados para realização do ensaio de antibiose em placa.

Isolados	**Meios Selecionados**		
01	m29	MAB	LB
02	m29	m615	LB
03	m29	MAB	LB
04	m29	MAB	LB
05	m29	SDA	MAB
06	m29	MAB	LB
07	m29	SDA	MAB
08	m29	SDA	MAB
09	m29	MAB	LB
10	m29	SDA	MAB
11	m29	m615	LB
12	m29	SDA	LB
13	m615	-	-
14	m29	SDA	MAB
15	m29	SDA	MAB
16	m29	SDA	MAB
17	m29	m615	LB
18	m29	SDA	MAB
19	m29	SDA	MAB
20	m29	SDA	MAB
21	m29	MAB	LB
22	m29	SDA	MAB
23	m29	SDA	MAB
24	m29	SDA	MAB
25	m29	SDA	MAB
26	m29	SDA	MAB
27	SDA	MAB	LB
28	m29	SDA	MAB
29	m615	SDA	MAB
30	SDA	MAB	LB
31	SDA	MAB	LB
32	SDA	MAB	LB
33	SDA	MAB	LB
34	SDA	MAB	LB
35	m29	SDA	LB
36	SDA	MAB	LB
37	m29	MAB	LB
38	SDA	MAB	LB
39	m29	SDA	MAB
40	SDA	MAB	LB

MAB-Ágar Bennett; LB-Ágar Luria-Bertani broth; DAS-Ágar Sabouraud Dextrose.
Fonte: o autor.

Para realização do ensaio de antibiose em placa, foram selecionados os três meios que apresentaram os melhores índices de crescimento microbiano em todos os micro-organismos (isolados e controle). 117 placas foram preparadas para o ensaio de antibiose, numa proporção de, 29 (24,79%) foram do tipo Ágar m29, 5 (4,27%) foram do Ágar m615, 29 (24,79%) foram do Ágar Sabouraud Dextrose, 34 (29,06%) foram do Ágar Bennett e 20 (17,09%) foram do ágar Luria-Bertani Broth (figura 24).

Figura 23. Gráfico demonstrando as quantidades de cada meio de cultura selecionado para o ensaio de antibiose.



Fonte: o autor.

O isolado de número 13 teve o ensaio de antibiose em placa realizado em triplicata apenas no meio 615, pelo motivo de não ter apresentado crescimento significativo nos demais meios (m29, SDA, MAB e LB).

6.3 Contagem de unidades formadoras de colônias

Para se contar as Unidades Formadoras de Colônias (UFC´s), todas as diluições foram plaqueadas em meio específico para o isolamento de micro-organismos de solo, meio Amido-Caseína Ágar (ACA), sendo a composição deste meio é rica em sais minerais, o que favorece o crescimento de micro-organismos típicos de específicos do solo. A contagem das UFC´s foi feita nas diluições que apresentaram colônias de micro-organismos que tiveram atividade inibitória de micro-organismos patogênicos (resultados positivos no ensaio de antibiose em placa). Estas mesmas diluições também foram plaqueadas em quatro meios de cultura não

específicos para crescimento de micro-organismos de solo (meio Ágar Nutriente (AN), Ágar Bennett (MAB), Ágar Luria-Bertani Broth (LB) e Ágar Mueller-Hinton (MH)). Os meios de crescimento microbiano não específicos são comumente utilizados na microbiologia para o crescimento da maioria dos micro-organismos bacterianos e fúngicos, e os resultados da contagem das UFC´s foram comparadas a fim de ser verificar a eficácia do meio ACA na seletividade de micro-organismos de solo (tabelas 05 e 06).

Tabela 05 – Média do número de colônias nos quatro meios de culturas não específicos para micro-organismos de solo.

Isolados	Ponto/ Profundidade/ Diluição	Nº de colônia no meio AN	Nº de colônia no meio MAB	Nº de colônia no meio LB	Nº de colônia no meio MH
01 e 05	1A/10cm/10^{-4}	>6	13	2	5*
03	1A/5cm/10^{-4}	1	4	1	>15
08 e 09	1B/5cm/10^{-5}	0	1	1	∞
16	2B/10cm/10^{-5}	∞	1	1	1
19, 20 e 40	1B/5cm/10^{-4}	1	>22	3	2
21	1B/5cm/10^{-6}	3	0	0	1
23	3A/10cm/10^{-4}	0	3	1	1
25	3B/5cm/10^{-4}	0	0	0	>18

AN: Ágar Nutriente. Fonte: o autor.
MAB: Ágar Bennett.
LB: Ágar Luria-Bertani.
MH: Ágar Mueller-Hinton.
∞: Maior que 300 UFC´s.
* Uma única colônia cobria aproximadamente 50% de toda a placa.

Tabela 06 – Comparativo dos números de Unidades Formadoras de Colônias (UFC´s) em meio específicos para isolamento de micro-organismos de solo com a média de UFC´s em meios não específicos.

Isolados	Ponto/ Profundidade/ Diluição	Log das UFC em meio ACA	Valor da média do Log de UFC´s nos meios não específicos*	Diferença percentual de UFC´s
01 e 05	1A/10cm/10^{-4}	333.333	700.000	+210%
03	1A/5cm/10^{-4}	100.000	550.000	+550%
08 e 09	1B/5cm/10^{-5}	2.000.000	750.000	-266,67%
16	2B/10cm/10^{-5}	1.000.000	1.000.000	0%
19, 20 e 40	1B/5cm/10^{-4}	233.333	700.000	+300%
21	1B/5cm/10^{-6}	23.333.333	1.000.000	-2.333,33%
23	3A/10cm/10^{-4}	100.000	17.500	-571,42%
25	3B/5cm/10^{-4}	200.000	62.500	-320%

ACA: Amido-Caseína Ágar. Fonte: o autor.
*Meios não específicos: (AN: ágar Nutriente, MAB: ágar Bennett, LB: ágar Luria-Bertani broth e MH: ágar Müeller-Hinton).

Os valores totais das médias aritméticas das UFC´s em meios não específicos mostraram grande diferença nos valores de UFC´s do meio ACA (meio específico para isolamento de micro-organismos de solo). Com exceção da diluição 2B/10cm/10^{-5}, que não

apresentou variação no valor da média de UFC, todas as outras diluições apresentaram variações bem significativas nos valores das médias de UFC´s, que variam em até 2.333,33%. Os resultados demonstraram uma considerável variação no número de colônias nos diferentes meios de culturas, o que significa que o meio ACA possibilitou o crescimento dos micro-organismos das amostras de solo.

6.4 Caracterização e identificação morfológica dos micro-organismos

6.4.1 Caracterização macromorfológica das colônias isoladas

A caracterização macromorfológica das colônias isoladas teve por objetivo a analise das formas de como as colônias se apresentavam nas placas em meio seletivo para isolamento de micro-organismos de solo, meio Amido-Caseína Ágar (ACA). Foram analisados: o tamanho, a forma, a elevação, as margens, a cor, a superfície, a densidade e a consistência das colônias isoladas (tabela 07).

Tabela 07 – Análise macromorfológica das colônias isoladas.

Isolados	Macromorfologia das colônias							
	Tamanho	**Forma**	**Elevação**	**Margem**	**Cor**	**Superfície**	**Densidade**	**Consistência**
01	14 mm	Puntiforme	Elevada	Inteira	Marrom	Opaca	Opaca	Membranosa
02	7 mm	Filamentosa	Plana	Crespa	Alaranjada	Brilhante	Translúcida	Butirácea
03	45 mm	Puntiforme	Umbilicada	Lobada	Branca	Opaca	Opaca	Quebradiça
04	4 mm	Circular	Convexa	Inteira	Creme	Brilhante	Translúcida	Viscosa
05	13 mm	Puntiforme	Pulvinada	Crenada	Alaranjada/ Marrom	Opaca	Opaca	Membranosa
06	5 mm	Irregular	Elevada	Inteira	Branca	Brilhante	Opaca	Butirácea
07	5 mm	Circular	Convexa	Filamentosa	Esbranquiçada	Opaca	Opaca	Quebradiça
08	8 mm	Irregular	Pulvinada	Crespa	Branca	Opaca	Opaca	Quebradiça
09	38 mm	Puntiforme	Pulvinada	Crespa	Esbranquiçada/ Marrom	Opaca	Opaca	Viscosa
10	10 mm	Irregular	Plana	Ondulada	Creme	Brilhante	Translúcida	Butirácea
11	11 mm	Filamentosa	Pulvinada	Filamentosa	Creme	Brilhante	Translúcida	Viscosa
12	34 mm	Irregular	Pulvinada	Crenada	Alaranjada	Opaca	Opaca	Membranosa
13	3 mm	Irregular	Pulvinada	Crenada	Creme	Brilhante	Opaca	Membranosa
14	1 mm	Puntiforme	Convexa	Inteira	Alaranjada/ Esbranquiçada	Brilhante	Opaca	Membranosa
15	6 mm	Puntiforme	Elevada	Inteira	Creme	Brilhante	Opaca	Viscosa
16	8 mm	Irregular	Côncava	Inteira	Bege	Opaca	Opaca	Quebradiça
17	1 mm	Puntiforme	Pulvinada	Crenada	Marrom escuro	Opaca	Opaca	Quebradiça
18	2 mm	Puntiforme	Plana	Inteira	Creme	Brilhante	Translúcida	Viscosa
19	6 mm	Rizoide	Pulvinada	Crenada	Branca/Marrom	Opaca	Opaca	Viscosa
20	10 mm	Puntiforme	Pulvinada	Crespa	Branca	Opaca	Opaca	Quebradiça
21	15 mm	Irregular	Pulvinada	Inteira	Marrom escuro/Branca	Opaca	Opaca	Quebradiça
22	2 mm	Filamentosa	Plana	Crenada	Branca	Brilhante	Opaca	Butirácea
23	9 mm	Rizoide	Côncava	Inteira	Alaranjada	Opaca	Opaca	Quebradiça

Isolados	Macromorfologia das colônias							
	Tamanho	**Forma**	**Elevação**	**Margem**	**Cor**	**Superfície**	**Densidade**	**Consistência**
24	7 mm	Circular	Pulvinada	Inteira	Branca	Opaca	Opaca	Quebradiça
25	2 mm	Circular	Pulvinada	Ondulada	Branca	Opaca	Opaca	Butirácea
26	15 mm	Filamentosa	Pulvinada	Filamentosa	Branca	Opaca	Opaca	Veluda
27	5 mm	Puntiforme	Plana	Inteira	Creme	Brilhante	Translúcida	Viscosa
28	5 mm	Circular	Umbilicada	Inteira	Branca	Opaca	Opaca	Quebradiça
29	15 mm	Filamentosa	Côncava	Crenada	Branca	Opaca	Opaca	Veluda
30	2 mm	Puntiforme	Elevada	Inteira	Creme	Brilhante	Opaca	Viscosa
31	3 mm	Irregular	Convexa	Inteira	Alaranjada	Brilhante	Translúcida	Viscosa
32	5 mm	Irregular	Plana	Ondulada	Alaranjada	Brilhante	Translúcida	Quebradiça
33	4 mm	Puntiforme	Côncava	Inteira	Branca	Brilhante	Opaca	Viscosa
34	1 mm	Irregular	Convexa	Crenada	Branca/Marrom	Opaca	Opaca	Viscosa
35	≈ 8 mm	Puntiforme	Umbilicada	Inteira	Branca esverdeada	Opaca	Opaca	Quebradiça
36	>12 mm	Irregular	Plana	Ondulada	Alaranjada	Brilhante	Translúcida	Butirácea
37	>3 mm	Irregular	Côncava	Ondulada	Alaranjada	Brilhante	Opaca	Viscosa
38	1 mm	Irregular	Plana	Ondulada	Creme	Brilhante	Translúcida	Butirácea
39	1 mm	Irregular	Convexa	Inteira	Alaranjada	Brilhante	Translúcida	Viscosa
40	< 1 mm	Puntiforme	Convexa	Inteira	Alaranjada	Brilhante	Translúcida	Viscosa

Tamanho: Diâmetro em milímetros. Referência: Koneman *et al*., (2006).
Forma: Circular, irregular, rizoide, filamentosa e puntiforme.
Elevação: Côncava, elevada, plana, umbilicada, pulvinada e convexa.
Margem: filamentosa, inteira, crespa, lombada, crenada e ondulada.
Cor: Alaranjado-esbranquiçada, alaranjada, alaranjada/marrom, bege, branca, branco-esverdeada, creme, esbranquiçada, esbranquiçada/marrom e marrom.
Superfície: Brilhante ou opaca.
Densidade: Opaca, translúcida, transparente, outra.
Consistência: Butirácea, quebradiça, membranosa, veluda e viscosa.

Para se chegar ao tamanho das colônias, foram calculadas as médias aritméticas do diâmetro das colônias, dadas em milímetros. Os tamanhos das colônias variaram de 1 a 45 mm de tamanho, apresentando uma média total de 8,375 mm.

As colônias apresentavam formas circulares, irregulares, rizoides, filamentosas e puntiformes. Destes, 5 isolados apresentavam-se circulares, 14 irregulares, 2 rizoides, 5 filamentosos e 14 puntiformes.

Quanto à elevação, as colônias apresentavam-se côncavas, elevadas, planas, umbilicadas, pulvinadas e convexas. Destas, 6 isolados apresentavam-se côncavas, 4 elevadas, 8 planas, 3 umbilicadas, 12 pulvinadas e 7 convexas.

As margens das colônias dos isolados apresentaram formas filamentosas, inteiras, crespas, lombadas, crenadas e onduladas. Destes isolados, 3 eram filamentosas, 18 inteiras, 4 crespas, 1 lombada, 8 crenadas e 6 onduladas.

As colônias isoladas apresentaram diversas colorações como: Alaranjada/ esbranquiçada, alaranjada, alaranjada/marrom, bege, branca, branco-esverdeada, creme, esbranquiçada, esbranquiçada/marrom e marrom. As colônias distribuíram-se em, 1 colônia de cor alaranjado-esbranquiçada, 9 alaranjadas, 1 alaranjada/marrom, 1 bege, 11 brancas, 1 branco-esverdeada, 9 cremes, 1 esbranquiçada, 4 esbranquiçada/marrons e 2 marrons.

As superfícies das colônias isoladas apresentaram uma superfície brilhante ou opaca, destas 10 colônias apresentavam superfícies brilhantes e outras 10 colônias apresentaram-se opacas.

Quanto à densidade, as colônias foram analisadas quanto a sua transparência, a opacidade e a translucidez, entretanto, nenhuma colônia apresentou-se transparente, ou as colônias eram opacas (28 colônias) ou translúcidas (12 colônias).

As colônias também foram analisadas quanto à consistência, e durante essa análise, observou-se se as colônias apresentavam-se como, butirácea (consistência de manteiga), quebradiça, membranosa, veluda ou viscosa. Na observação da macromorfologia das colônias, 7 apresentaram-se com consistência butirácea, 12 quebradiças, 5 membranosas, 2 veludas e 14 viscosas.

A caracterização morfológica permitiu realizar uma triagem dos micro-organismos isolados, o que facilitará uma posterior identificação bioquímica e/ou molecular.

6.4.2 Coloração de Gram

A coloração de Gram teve o objetivo a verificação da pureza das culturas e a forma

dos micro-organismos, ou seja, se os mesmos possuíam formas filamentosas ou se fragmentavam em bacilos, cocos, víbrio ou cocobacilos, e os agrupamentos das células, como: diplococo, estreptococo, estafilococo ou diplobacilo.

Na coloração de Gram, os micro-organismos bacterianos podem ser divididos em Gram-positivo (bactérias que se coram em violeta-escuro) e Gram-negativo (bactérias que se coram de rosa-vermelho), enquanto isso, os micro-organismos micóticos (fungos e leveduras) têm suas paredes e núcleos corados de roxo. A tabela 08 traz os resultados obtidos da observação microscópica da coloração dos isolados microbianos.

Tabela 08 – Resultados da coloração de Gram dos isolados microbianos.

Isolados	Coloração de Gram	Isolados	Coloração de Gram
01	Bactéria Gram +	21	Levedura
02	Levedura	22	Bactéria Gram –
03	Levedura	23	Fungo
04	Bactéria Gram +	24	Fungo
05	Fungo	25	Levedura
06	Bactéria Gram –	26	Levedura
07	Levedura	27	Bactéria Gram –
08	Fungo	28	Levedura
09	Bactéria Gram +	29	Fungo
10	Bactéria Gram +	30	Levedura
11	Bactéria Gram –	31	Bactéria Gram +
12	Fungo	32	Levedura
13	Bactéria Gram –	33	Bactéria Gram +
14	Levedura	34	Bactéria Gram –
15	Bactéria Gram –	35	Levedura
16	Fungo	36	Bactéria Gram –
17	Levedura	37	Levedura
18	Bactéria Gram –	38	Bactéria Gram –
19	Levedura	39	Bactéria Gram –
20	Levedura	40	Levedura

Total de Gram-positivo: 6
Total de Gram-negativo 11
Total de fungos: 7
Total de leveduras: 16

Fonte: o autor.

Na visualização dos esfregaços dos micro-organismos corados, pode-se verificar a diversidade de formas existentes nos isolados. Dos 40 micro-organismos isolados, 6 (15%) eram de bactérias Gram-positivo, 11 (27,5%) de bactérias Gram-negativo, 7 (17,5%) de fungos e 16 (40%) de leveduras.

6.4.3 Caracterização da micromorfologia dos isolados

Com a coloração de Gram dos esfregaços dos micro-organismos, pode-se observar microscopicamente a morfologia dos isolados, o que possibilitou verificar a forma e o agrupamento dos micro-organismos, além da pureza das culturas (tabela 09).

TABELA 09 – Análise da micromorfologia dos micro-organismos corados pelo método de Gram.

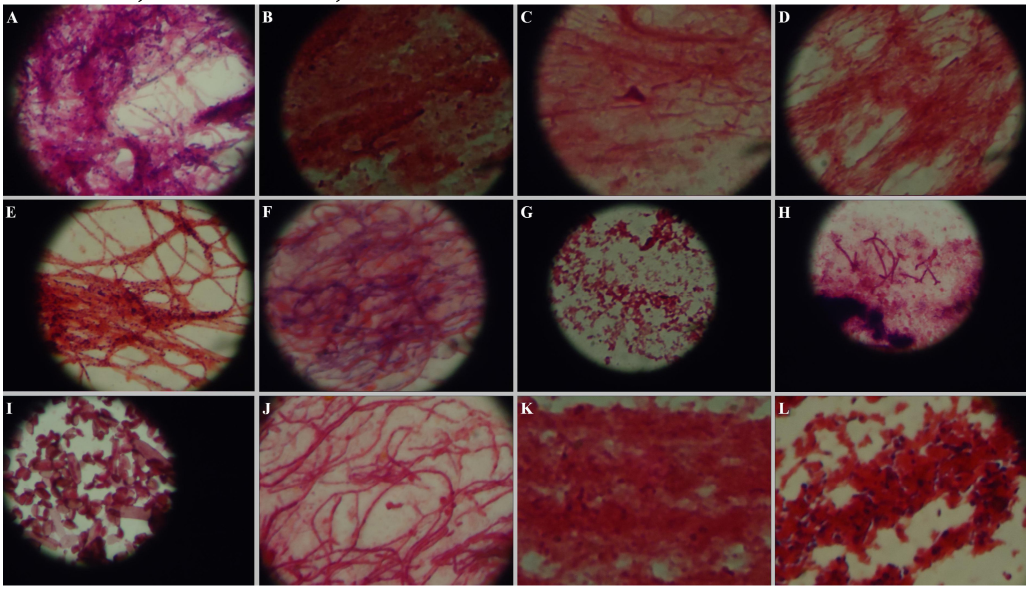
Isolados	Coloração	Micromorfologia dos micro-organismos		
		Forma	**Agrupamento**	**Cultura**
01	Gram +	Coco	Filamentoso	Pura
02	Levedura	Bastonete	-	Pura
03	Levedura	Baga	Micélio	Pura
04	Gram +	Coco	-	Pura
05	Fungo	Filamentosa	Micélio	Pura
06	Gram −	Coco	-	Pura
07	Levedura	Espiralada	-	Pura
08	Fungo	Filamentosa	Micélio	Pura
09	Gram +	Coco	Filamentoso	Pura
10	Gram +	Bacilo	-	Pura
11	Gram −	Coco	-	Pura
12	Fungo	Filamentosa	Micélio	Pura
13	Gram −	Coco	-	Pura
14	Levedura	Oval	-	Pura
15	Gram −	Coco	-	Pura
16	Fungo	Filamentosa	Micélio	Pura
17	Levedura	Bastonete	-	Pura
18	Gram −	Bacilo	-	Pura
19	Levedura	Bastonete	-	Pura
20	Levedura	Filamentosa	-	Pura
21	Levedura	Bastonete	-	Pura
22	Gram −	Bacilo	-	Pura
23	Fungo	Filamentosa	Micélio	Pura
24	Fungo	Filamentosa	Micélio	Pura
25	Levedura	Oval	-	Pura
26	Levedura	Bastonete	-	Pura
27	Gram −	Coco	-	Baixa contaminação
28	Levedura	Bastonete	-	Pura
29	Fungo	Filamentosa	Micélio	Pura
30	Levedura	Filamentosa	-	Levemente contaminada
31	Gram +	Bacilo	-	Pura
32	Levedura	Bastonete	-	Contaminada por Leveduras
33	Gram +	Coco	-	Contaminada por Leveduras
34	Gram −	Coco	-	Pura
35	Levedura	Oval	-	Pura
36	Gram −	Coco	-	Contaminada por coco -
37	Levedura	Oval	-	Pura
38	Gram −	Coco	-	Pura
39	Gram −	Bacilo	-	Pura
40	Levedura	Oval	-	Pura

Fonte: o autor.

Com a análise microscópica dos esfregaços dos isolados, pode-se assim, observar que dos 17 micro-organismos bacterianos (42,5% do total de isolados), apenas 6 isolados eram actinomicetos (15% do total de isolados), sendo, 4 cocos e 2 bacilos Gram-positivos. 8 cocos e 3 bacilos Gram-negativos.

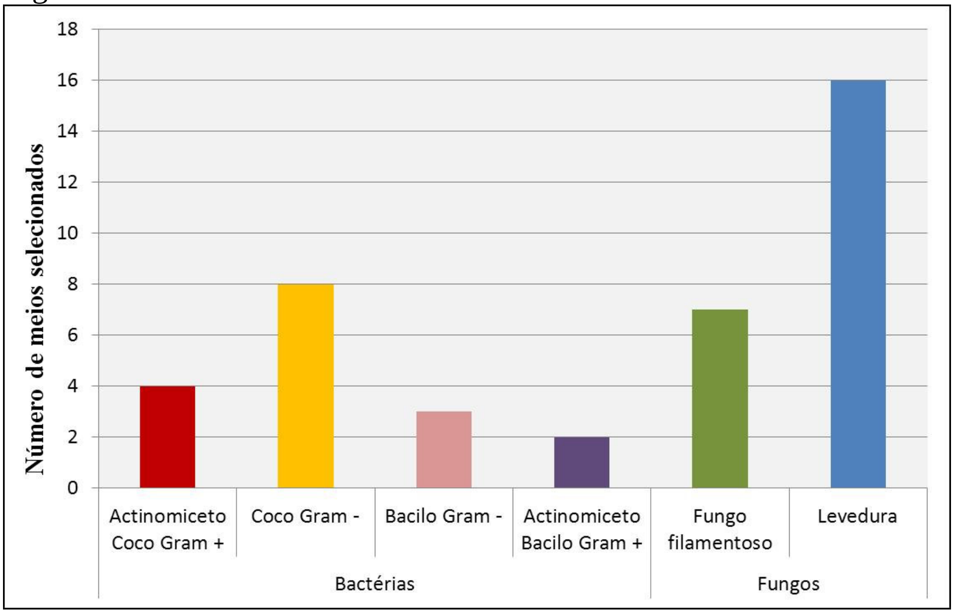
Dos 23 isolados micóticos (57,5% do total), 7 são de fungos filamentosos, 7 de leveduras em formato de bastão (bastonetes), 1 levedura em forma de baga, 1 leveduras espiralada, 5 leveduras ovais e 2 leveduras filamentosas (Figura 25 e 26).

Figura 24: Fotomicrografias dos isolados com atividade antimicrobiana corada pelo método de Gram. **A** – isolado 01; **B** – isolado 03; **C** – isolado 05; **D** – isolado 08; **E** – isolado 09; **F** – isolado 16; **G** – isolado 19; **H** – isolado 20**; I** – isolado 21; **J** – isolado 23; **K** – isolado 25 e **L** – isolado 40.



Fonte: o autor.

Figura 25. Gráfico demonstrando a quantidade dos tipos de micro-organismos isolados.



Fonte: o autor.

Na observação microscópica dos esfregaços corados pelo método de Gram, os isolados 27, 30, 32, 33 e 36 apresentaram contaminação por outros micro-organismos, e por haver a necessidade de se obter colônias puras, foram feitos repiques consecutivos, utilizando-se da técnica de esgotamento (figura 15), descrita por Antunes, (1995) até a obtenção de culturas puras, que foram posteriormente confirmadas pela visualização microscópica dos esfregaços corados pelo método de Gram.

Foram cruzados os resultados obtidos da observação microscópica dos esfregaços dos micro-organismos isolados pela coloração de Gram com os locais de coletas das amostras de solo, e os dados são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Local de coleta de cada tipo de isolado.

Isolados	Sítio-Ponto/ Profundidade- Diluição	Coloração de Gram	Forma
01	1A / 10 cm - 10^{-4}	+	Coco
02	1A / 5 cm - 10^{-5}	Levedura	Bastonete
03	1A / 5 cm - 10^{-4}	Levedura	Baga
04	1A / 5 cm - 10^{-6}	+	Coco
05	1A / 10 cm - 10^{-4}	Fungo	Filamentoso
06	1A / 10 cm - 10^{-4}	−	Coco
07	1A / 10 cm - 10^{-4}	Levedura	Espiralada
08	1B / 5 cm - 10^{-5}	Fungo	Filamentoso
09	1B / 5 cm - 10^{-5}	+	Coco
10	1B / 10 cm - 10^{-4}	+	Bacilo
11	1B / 10 cm - 10^{-4}	−	Coco
12	2A / 10 cm - 10^{-4}	Fungo	Filamentoso
13	2A / 10 cm - 10^{-5}	−	Coco
14	2B / 10 cm - 10^{-4}	Levedura	Oval
15	2B / 10 cm - 10^{-4}	−	Coco
16	2B / 10 cm - 10^{-5}	Fungo	Filamentoso
17	2B / 5 cm - 10^{-6}	Levedura	Bastonete
18	2A / 10 cm - 10^{-4}	−	Bacilo
19	1B / 5 cm - 10^{-4}	Levedura	Bastonete
20	1B / 5 cm - 10^{-4}	Levedura	Filamentosa
21	1B / 5 cm - 10^{-6}	Levedura	Bastonete
22	1B / 5 cm - 10^{-6}	−	Bacilo
23	3A / 10 cm - 10^{-4}	Fungo	Filamentoso
24	3B / 5 cm - 10^{-4}	Fungo	Filamentoso
25	3B / 5 cm - 10^{-4}	Levedura	Oval
26	1A / 5 cm - 10^{-5}	Levedura	Bastonete
27	1A / 10 cm - 10^{-6}	−	Coco
28	1B / 10 cm - 10^{-6}	Levedura	Bastonete
29	1B / 5 cm - 10^{-4}	Fungo	Filamentoso
30	1B / 10 cm - 10^{-6}	Levedura	Filamentosa
31	1B / 10 cm - 10^{-6}	+	Bacilo
32	2A / 5 cm - 10^{-5}	Levedura	Bastonete
33	2A / 5 cm - 10^{-5}	+	Coco
34	2B / 5 cm - 10^{-4}	−	Coco
35	2B / 10 cm - 10^{-6}	Levedura	Oval
36	2B / 5 cm - 10^{-6}	−	Coco
37	2B / 5 cm - 10^{-6}	Levedura	Oval
38	3B / 10 cm - 10^{-6}	−	Coco
39	1B / 10 cm - 10^{-6}	−	Bacilo
40	1B / 5 cm - 10^{-4}	Levedura	Oval

Fonte: o autor.

Do ponto **A,** do sítio de coleta **1**, foram isolados dois cocos Gram-negativos, dois cocos Gram-positivos, quatro leveduras e um fungo filamentoso, totalizando 9 micro-organismos. Do ponto **B**, do mesmo sítio de coleta (**1**), foram isolados um coco Gram-negativo, um coco Gram-positivo, dois bacilos Gram-negativos, dois bacilos Gram-positivos, seis leveduras e dois fungos filamentosos, totalizando 14 micro-organismos.

Foram isolados do ponto **A**, sítio **2**, um coco Gram-negativo, um coco Gram-positivo, um bacilo Gram-negativo, uma levedura e um fungo filamentoso, totalizando 5 micro-

organismos. Do ponto **B**, ainda no sítio **2**, foram isolados três cocos Gram-negativos, um coco Gram-positivo, quatro leveduras e um fungo filamentosos, totalizando 8 micro-organismos.

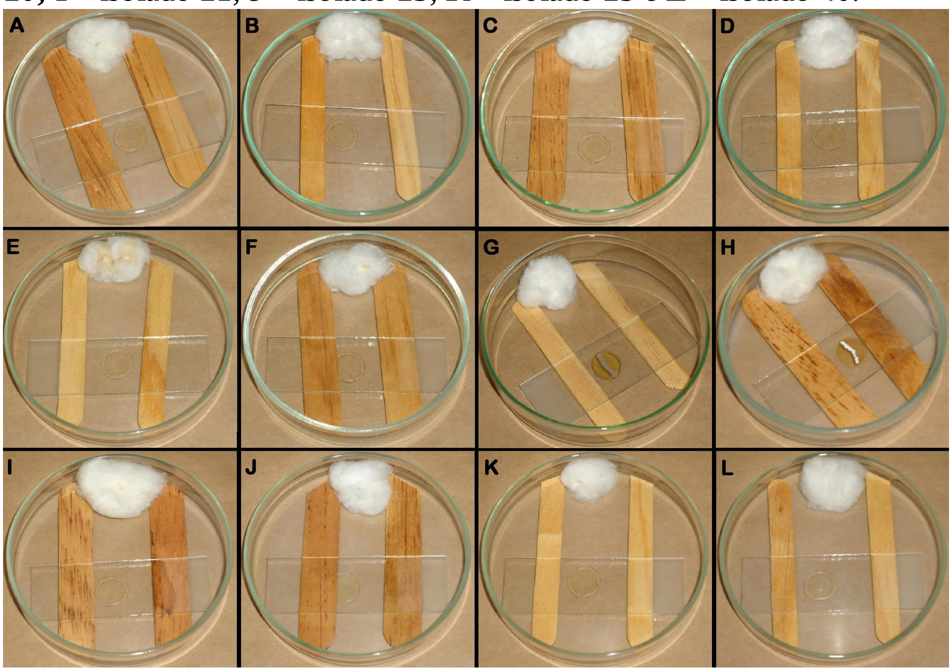
O ponto **A** do sítio **3** teve apenas um fungo filamentoso isolado, entretanto, o ponto **B** teve um coco Gram-negativo, uma levedura e um fungo filamentoso isolado da amostra, totalizando 3 micro-organismos.

Os actinomicetos foram caracterizados por macroscopia das colônias, microscopia dos esfregaços colorados pelo método de Gram e pela micromorfologia dos micélios dos microcultivos. Estas análises visaram uma caracterização de gênero e foram baseadas nas descrições de Larone, (1993); Fischer & Cook, (2001); Watanabe, (2002) e The University of Adelaide, (2011).

6.4.4 Caracterização morfológica dos microcultivos

A técnica do microcultivo, adaptada de Stanley *et al*., (1989) e Holt *et al*., (1989) possibilitou a observação de várias características morfológicas dos isolados que apresentaram atividade bioativa no ensaio de antibiose, tais como: ramificação do micélio sobre o substrato, formação de micélio aéreo, fragmentação e a produção dos esporos (figura 27 e tabela 11).

Figura 26: Fotografias dos microcultivos dos isolados com atividade bioativa para antibiose. **A** – isolado 01; **B** – isolado 03; **C** – isolado 05; **D** – isolado 08; **E** – isolado 09; **F** – isolado 16; **G** – isolado 19; **H** – isolado 20**; I** – isolado 21; **J** – isolado 23; **K** – isolado 25 e **L** – isolado 40.



Fonte: o autor.

Tabela 11 – Micromorfologia dos microcultivos dos isolados microbianos bioativos para antibiose.

Isolados	Morfologia do microcultivo									
	Tamanho (diâmetro)	**Elevação**	**Bordas**	**Estrutura**	**Brilho**	**Cor**	**Consistência/ aspecto**	**Forma**	**Quantidade**	**Superfície**
01	5 mm	Achatada	Lisa	Granulosa	Transparente	Incolor	-	Circular	Abundante	Brilhante
03	-	-	Filamentosa	Filamentosa	Transparente	Incolor	-	Circular	Escasso	-
05	4 mm	Achatada	Lisa	Granulosa	Transparente	Incolor	-	Circular	Abundante	Brilhante
08	3 mm	Achatada	Lisa	Granulosa	Transparente	Branca	Leitosa	Circular	Abundante	Brilhante
09	4 mm	Achatada	Lisa	Lisa	Transparente	Branca	Leitosa	Circular	Abundante	Brilhante
16	-	Ondulada	-	Granulosa	Transparente	Incolor	-	Puntiforme	Escasso	-
19	3 mm	Elevada	Filamentosa	Filamentosa	Opaca	Marrom	Quebradiça	Rizoide	Abundante	Fosca
20	3 mm	Protuberante	Filamentosa	Filamentosa	Opaca	Branca	Quebradiça	Rizoide	Abundante	Fosca
21	-	Achatada	Filamentosa	Filamentosa	Opaca	Branca	Quebradiça	Filamentosa	Escasso	Fosca
23	5 mm	Convexa	Lisa	Lisa	Brilhante	Incolor	-	Irregular	Abundante	Brilhante
25	4 mm	Convexa	Filamentosa	Filamentosa	Brilhante	Incolor	-	Rizoide	Abundante	Fosca
40	5 mm	Convexa	Lisa	Granulosa	Translúcida	Branca	Leitosa	Irregular	Abundante	Brilhante

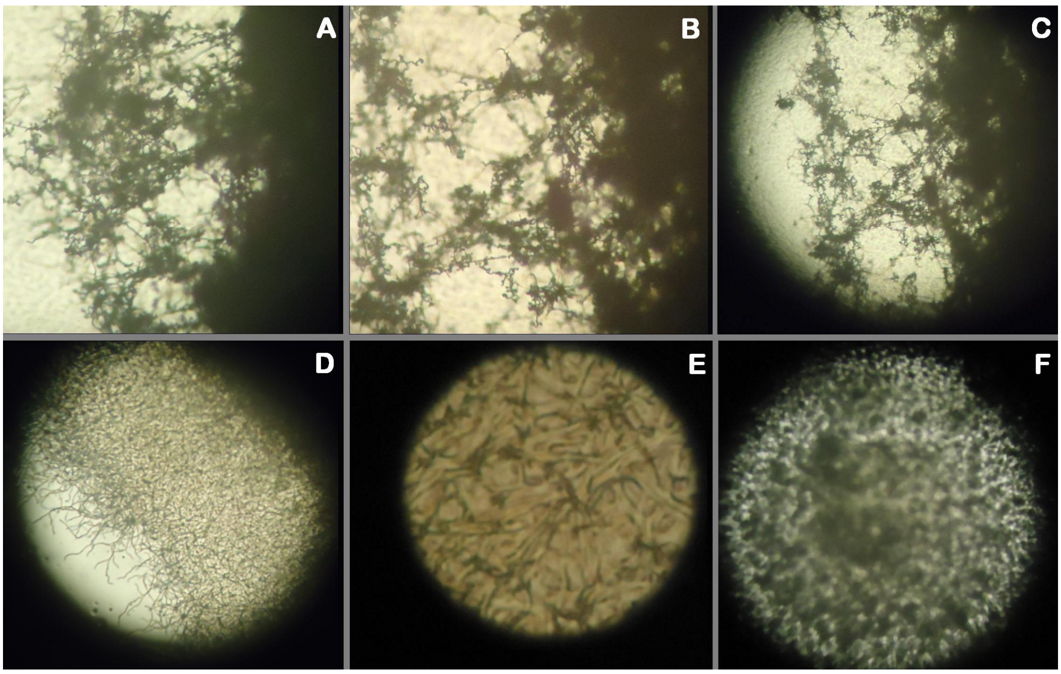
Tamanho: Diâmetro em milímetros (Grande ≥ 5 mm) (Média ≥ 2 mm e < 5 mm) (Pequena 2 < mm).
Referência: Koneman *et al.*, (2006).
Elevação: Côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada e convexa.
Bordas: Lisas, laceradas, lombadas, filamentosas e onduladas.
Estrutura: Lisa, granulosa, filamentosa e rugosa.
Brilho: Brilhante, Opaca, Translúcida, Transparente, outra.
Cor: Incolor, Branca, Amarela, Preta, Camurça, Laranja, outra.
Consistência/aspecto: Butirácea, viscosa, úmida, membranosa, quebradiça, leitosa, outra.
Forma: Circular, irregular, rizoide, filamentosa e puntiforme.
Quantidade: Escasso, Moderado, Abundante.
Superfície: Brilhante, Fosca.

Os micro-organismos com atividade bioativa para antibiose apresentaram na observação dos microcultivos uma morfologia bem diversificada. Alguns isolados apresentaram cores pouco diversificadas de seus micélios, principalmente do micélio aéreo, que apresentaram cores como: branca (isolados 08, 09, 20, 21 e 40), marrom (isolado 19) ou incolor (isolados 01, 03, 05, 16, 23 e 25).

Alguns micro-organismos isolados apresentaram crescimento linear (isolado 19 e 20), entretanto, a maioria apresentou um crescimento circular, e destes foram medidas os diâmetros do cultivo, que variaram de 3 a 5 mm. Os isolados 03 e 21 apresentaram uma transparência que impossibilitou sua medição.

Apesar da dificuldade de visualização dos isolados na microscopia dos microcultivos, principalmente devido à transparência dos micro-organismos e da não utilização de corantes, alguns isolados apresentaram boa visualização, como os isolados 03, 19, 20, 21, e 25, que apresentaram estruturas e bordas visivelmente filamentosas na observação microscópica do microcultivo com aumento de 400x. O isolado 40 apresentou estruturas granulosas e bordas lisas (figura 28).

Figura 27: Fotomicrografias dos micélios dos microcultivos de micro-organismos isolados com atividade bioativa para antibiose. **A** – isolado 03; **B** – isolado 19; **C** – isolado 20; **D** – isolado 21; **E** – isolado 25; **F** – isolado 40. Aumento 400x.



Fonte: o autor.

A análise da consistência e do aspecto foi realizada tocando-se os cultivos com

o auxílio de uma agulha bacteriológica durante a visualização. Os isolados 08, 16 e 40 apresentaram consistência leitosa, e os isolados 19, 20 e 21 apresentaram-se quebradiços. Os isolados 01, 03, 05, 16, 23 e 25 apresentavam elevação tão achatada ou quantidade muito escassa que não foi possível à verificação de suas consistências e de seus aspectos.

6.5 Triagem de isolados com atividade antimicrobiana

Os quarenta micro-organismos isolados de amostras de solo foram triados em ensaios de antibiose em placa. O teste selecionado para triagem em placa foi o ensaio de antibiose em traço cruzado (cris-cross). A intensidade da inibição foi medida pela distância entre o micro-organismo isolado do solo e os micro-organismos-controle (micro-organismos padronizados para ensaios de antibiose). Dos quarenta micro-organismos isolados, doze (30%) apresentou inibição no crescimento dos micro-organismos-controle. O percentual de isolados apresentou-se abaixo do observado na literatura, Ujikawa, *et al*, (2005) isolou do solo do cerrado região de Araraquara 64 cepas, 34 (53,1%) apresentaram atividade antimicrobiana quando cultivadas em meio sólido, sendo que 21 cepas apresentaram atividade contra *S. aureus*, 17 contra *A.oryzae*, 13 contra *C. albicans* e 6 contra *E. coli*.

Destes micro-organismos isolados com atividade bioativa para antibiose, 2 são cocos Gram-positivo, 6 são de leveduras e 4 são de fungos filamentosos.

Os actinomicetos isolados de 09 e 16, de maneira geral, apresentaram pouca atividade contra *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positivo), como observado por Rangaswami & Oblisami, (1967) que descreve o antagonismo de diversos actinomicetos, isolados de diferentes solos da Índia, sobre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo.

O actinomiceto isolado 01 que apresentou uma inibição moderada (++) ($3 \geq 10$ mm) contra *Staphylococcus aureus*. Contra *Candida* (levedura) os actinomicetos os inibiram moderadamente num aspecto geral, especialmente o isolado 01, que fortemente (+++) (> 10 mm) inibiram esta levedura. As bactérias Gram-negativo (*Pseudomonas aeruginosa*) e os Bacilos Álcool-Ácido Resistentes – **BAAR** (*Mycobacterium smegmatis)* apresentaram, de maneira geral, fraca inibição (+) ($3 < 0$ mm) pelos actinomicetos (com exceção do isolado 16). Estes resultados apoiam a observação de González *et al.*, (2005) que demostrou que isolados de actinomicetos

apresentam maior atividade contra bactérias Gram-positivo em relação às bactérias Gram-negativo e Micobactérias (BAAR).

No trabalho realizado por Albertton *et al*, (2006) os *Streptomyces* apresentaram efeito inibitório sobre as bactérias patogênicas Gram-positiva, como ***S. aureus***, porém não sobre bactérias Gram-negativo como *Salmonella spp*., *Pseudomonas spp*. e *Escherichia coli*. Estes resultados são parcialmente semelhantes aos desta pesquisa, onde os actinomicetos inibiram a bactéria Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa*.

Os fungos filamentosos (isolados 03, 05, 08, 19, 20 e 23), inibiram de forma moderada *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positivo), fraca inibição contra *Candida albicans* (fungo leveduriforme) e inibição moderada contra as bactérias *Mycobacterium smegmatis* (BAAR) e *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria Gram-negativo).

Os isolados 21, 25 e 40 (leveduras) apresentaram pouco desempenho na inibição dos micro-organismos-controle, especialmente contra *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positivo) e *Mycobacterium smegmatis* (BAAR), onde apresentaram uma inibição muito fraca ou nula. Contra a *Candida albicans* (levedura) e *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria Gram-negativo), os resultados mostraram uma inibição fraca. A tabela 12 mostra os isolados com atividade antimicrobiana e os micro-organismos-controle inibidos por eles.

Tabela 12 – Resultado do ensaio de antibiose pelo método do traço cruzado.

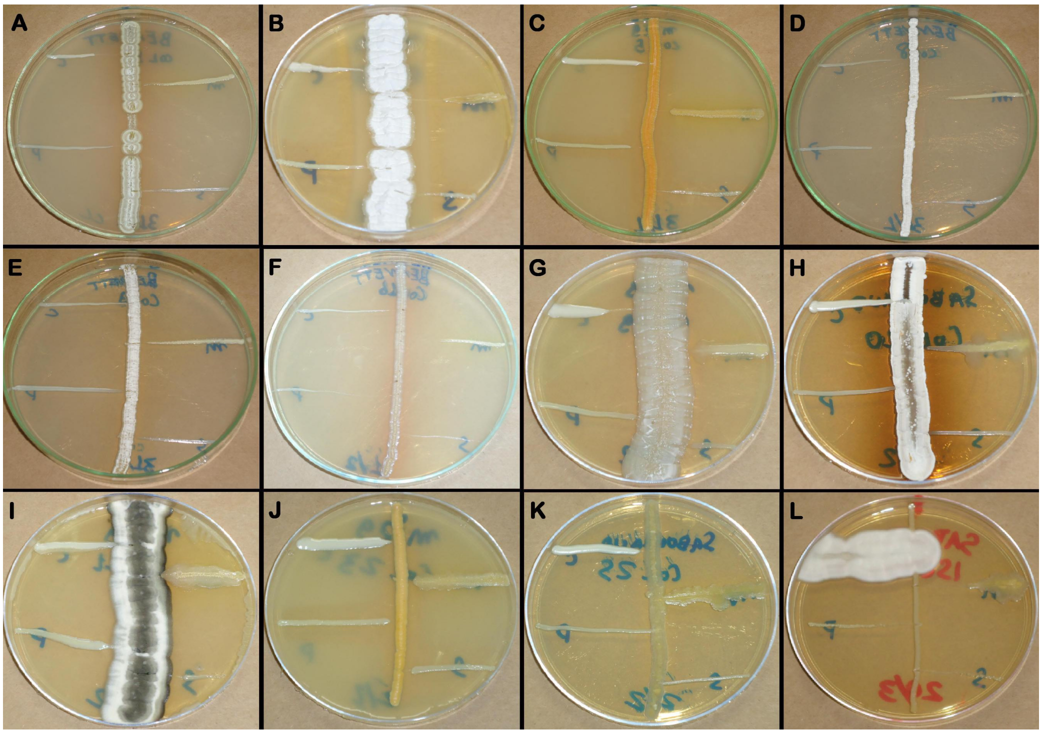
Isolados	*Sthaphylococcus*	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
01	+ +	+ + +	+ +	+
03	+ +	+ +	+ +	+
05	+ +	+ +	+ +	+ +
08	+ + +	+ +	+ + +	+ + +
09	**SI**	**SI**	+	**SI**
16	+	+	+ +	+ + +
19	+	+	+ + +	+ + +
20	+	**SI**	+	+
21	**SI**	+	**SI**	+
23	+ +	+	+ +	+ +
25	+	+	**SI**	+
40	**SI**	**SI**	+	**SI**

Sem inibição: SI. Referência: Koneman *et al*., (2006).
Fraca inibição: + (3 < 0 mm).
Inibição moderada: ++ (3 ≥ 10 mm).
Forte inibição: +++ (> 10 mm).

Alguns micro-organismos, como os isolados 01, 08, 16 e 19, de forma geral,

apresentaram bons resultados na inibição de um, dois, três ou até todos os quatro micro-organismos-controle (figura 29).

Figura 28: Fotografias da antibiose dos isolados pelo método do traço cruzado. **A** – isolado 01 em meio MAB; **B** – isolado 03 em meio m29; **C** – isolado 05 em meio m29; **D** – isolado 08 em meio MAB; **E** – isolado 09 em meio MAB; **F** – isolado 16 em meio MAB; **G** – isolado 19 em meio m29; **H** – isolado 20 em meio SDA**; I** – isolado 21 em meio m29; **J** – isolado 23 em meio m29; **K** – isolado 25 em meio SDA e **L** – isolado 40 em meio SDA.



Fonte: o autor.

Dos micro-organismos produtores de metabólitos bioativos isolados do solo por Rodrigues, (2006), o gênero Streptomyces representou 70% dos isolados produtores de compostos bioativos e o gênero Nocardia representou 20% dos micro-organismos com atividade antimicrobiana, e o número de actinomicetos que apresentaram atividade antimicrobiana isolados nesta pesquisa foi bem menor do que o esperado, apenas três foram isolados (01, 09 e 16), e contrariamente, esperava-se isolar um número bem menor de leveduras em relação aos actinomicetos, isso porque, no plaqueamento, foi utilizado um meio sólido específico para o isolamento de actinomicetos, o meio Amido-Caseína Ágar (ACA). O insucesso no isolamento de actinomicetos da rizosfera pode ser devido ao fato de a suspensão utilizada estar muito diluída. Keast & Tonkin, (1983) também citam dificuldades em isolar actinomicetos de rizosfera.

Ujikawa, (2003) observou uma diferença no número de micro-organismos isolados numa mesma região em períodos distintos. Ele observou que um número maior de actinomicetos isolados era registrado em períodos de chuvas recentes do que períodos de estiagens prolongadas, tal fator pode ter contribuído para o número pequeno de actinomicetos terem sidos isolados nesta pesquisa, uma vez que, a coleta do solo foi realizada no mês de novembro, em alta temporada do “verão amazônico”.

Durante o repique dos isolados em meios específicos para crescimento de micro-organismos de solo, também estes foram repicados em meio Amido-Caseína Ágar acrescido de nistatina (ACA+N), e a nistatina, sendo um antifúngico, foi acrescentada ao meio na tentativa de inibição dos fungos (tabela 03), e mesmo assim, fungos e leveduras apresentaram crescimento normal ou apenas uma pequena redução no crescimento em comparação ao meio ACA sem o acréscimo de nistatina (isolados 05, 08, 19, 20, 23, e 40).

A nistatina é um antifúngico poliênico do tipo tetraeno, e a adição de nistatina no meio de isolamento favorece o isolamento de actinomicetos produtores de antibióticos poliênicos, entretanto, Ujikawa, (2003) verificou no isolamento de micro-organismos do solo do cerrado brasileiro que, muitas destas cepas de micro-organismos eram altamente produtoras de antifúngicos semelhantes à nistatina, tornando-os assim, resistentes a inibição pela nistatina.

Liu *et al.*, (2007) além de analisarem a atividade antimicrobiana, verificaram atividade antitumoral e outras propriedades medicinais de 155 micro-organismos isolados do solo e de plantas, a maioria de actinomicetos, na cidade de Xishuangbanna, localizada na China. Os resultados obtidos mostraram que 42% dos isolados exibiram antagonismo contra cepas patogênicas e 54,5% mostraram uma boa inibição das células tumorais.

7 CONCLUSÕES

1. O solo da savana amazônica amapaense apresentou uma população microbiana bastante heterogênea quanto à localização dos sítios de coleta, e as amostras de solo coletadas ao sul do Estado apresentaram uma população de micro-organismos bem mais diversificada em relação ao sítio localizado ao norte.

2. Esperava-se encontrar uma predominância de actinomicetos nos micro-organismos isolados do solo da savana, entretanto, os actinomicetos representaram apenas 6 dos 40 micro-organismos isolados, sendo os restantes formados por 11 bactérias Gram-negativo, 7 fungos filamentosos e 16 leveduras.

3. Os 40 micro-organismos isolados do solo foram testados para antibiose em placa pelo método do traço cruzado (cris-cross), e destes apenas 12 apresentaram atividade inibitória contra pelo menos um micro-organismo-controle.

4. Os actinomicetos apresentaram forte atividade inibitória contra bactérias Gram-negativo. De forma geral, as leveduras e os fungos filamentosos não tiveram forte inibição contra os micro-organismos-controle, entretanto, apresentaram inibição moderada à fraca contra quase todos os micro-organismos testados.

5. Os actinomicetos, os fungos filamentosos e as leveduras isoladas do solo que apresentaram atividade inibitória possivelmente apresentam grande potencial de bioprospecção para produção de substâncias antimicrobianas.

8 PERSPECTIVAS

1. Avaliar a capacidade dos micro-organismos mais promissores na produção de compostos bioativos contra outros micro-organismos, utilizando-se de diferentes metodologias.

2. Purificar, classificar, identificar a estrutura química fundamental (por espectroscopia de ressonância magnética nuclear) e testar os metabólitos secundários bioativos.

3. Identificar os micro-organismos triados para antibiose por métodos moleculares de sequenciamento da região 16S do DNA.

4. Testar a toxicidade pré-clínica dos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana produzida pelos micro-organismos isolados.

5. Isolar mais micro-organismos de outros pontos amostrais do solo da savana e de outros ecossistemas, além de testá-los para antibiose contra outros micro-organismos-controle, *in vitro* e em *in vivo*.

9 REFERÊNCIAS

AGUIAR, L.M.S.; MACHADO, R.B.; MARINHO-FILHO, J. **A Diversidade Biológica do cerrado.** In: AGUIAR, L.M.S.; CAMARGO, A.J.A. (Ed.). Cerrado: Ecologia e Caracterização. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnologia, 2004, 249 p.

ALBERTON, L. R. *et al*. **Evaluation of the potential applicability of Streptomyces viridosporus T7 A crude fermentation extract in veterinary medicine**. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, v. 9, n.1, p. 41-47, 2006.

ANTUNES, G. S. **Manual de Diagnóstico Bacteriológico**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 278p.

ARAUJO, J.M. **Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos.** In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p.351-367.

BACHIEGA, G.L.1; VILEGAS, W.2; UJIKAWA, K. **Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. v. 26, n. 1, p. 29-37. São Paulo. 2005.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; XAVIER, D.F.; BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. **Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão.** Revista de Microbiologia, São Paulo, v.13, n.3, p.250-263, 1982.

BALL, S.; BESSEL, C. J.; MORTMER, A. **The production of polyenic antibiotics by soil *Streptomycetes*.** J. General Microbiology., v.17, p.96-103, 1957.

BARTH, A.L.; BARROS, E.; MACHADO, A. **Resistência Bacteriana.** In: BARROS, E.; BITTENCOURT, H.; CARAMORI, M.L.; MACHADO, A. **Antimicrobianos – consulta rápida.** 3 ed. Porto Alegre: Artimed, 2001. p. 27 – 31.

BAUER AW, KIRBY MDK, SHERIES JC, TRUCK M 1966. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** Am J Clin Pathol 45: 493-496.

CATTELAN, A.J.; VIDOR, C. **Sistemas de culturas e a população microbiana do solo.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v.14, p.125-132, 1990.

CEYLAN, O; OKMEN, G; UGUR, A. **Isolation of soil Streptomyces as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria.** EurAsia J BioSci. 2008. 2, 9, 73-82.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. **Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by Streptomyces species.** PNAS., v. 100, p. 14555-14561, 2003.

CHAMBERS, H.F. **Antimicrobianos: considerações Gerai**s; In: GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 10 ed. Rio de Janeiro: Mc-Graw Hill, 2003. p.859 – 875.

CHATER, K.F. **Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics.** Philosofical Translactions of the Royal Society B, [London], United Kingdon, v. 361, p. 761 – 798, 2006.

COELHO, R.; DROZDOWICZ, A. **The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil**. Révue d. Ecologie et de Biologie du Sol, Paris, v.15, p.459-473, 1978.

COHEN F.L. & TARSKY, D. **Microbial resistance to drug therapy: a review. State of the Science**. 25:51-67, 1997.

CROSS, T. **Growth and examination of actinomycetes – Some Guidelines**. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M.E., HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** New York: William Wilkins, 1989. v. 4.

CRUMP, B. C. ARMBRUST, E. V. BAROSS, J. A. **Phylogenetic Analysis of Particle-Attached and Free-Living Bacterial Communities in the Columbia River, Its Estuary, and the Adjacent Coastal Ocean.** Applied and Environmental Microbiology.65 (7). 3192–3204. 1999.

CUNHA, I.G.B.; SOBRINHO, T.J.S.P.; SILVA, R.E.A.; AMORIM, E.L.C.; ARAUJO, J.M. **Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito Streptomyces sp.** EBR49-A UFPEDA. Revista Brasileira de Farmácia., 90(2): 120-123. Rio de Janeiro, 2009.

CUPPELS, D; KELMAN, A. **Evaluation of seletive media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue.** Phytopathology, v. 64, p. 75-468, 1973.

DEAN, D.A.; BURCHARD, K. **Fungal infection in surgical patients**. *Am J Surgery* 1996; 171:374-80.

DEMAIN, A.L. **Microbial Biotechnology. Trends Biotechnol**. 2000**;** 18(1):26-31. peptidoglycan synthesis. *J Antibiot* 1979**;** 32:978-84.

DUARTE, G. F., ROSADO, A. S., SELDIN, L., ARAUJO, W., VAN ELSAS, J. D., **Analysis of Bacterial Community Structure in Sulfurous-Oil-Containing Soils and Detection of Species Carrying Dibenzothiophene Desulfurization (dsz) Genes.** Applied And Environmental Microbiology. v.67(3), p.1052 1062, mar 2001.

EMBLEY, T.M.; STACKEBRABDT, E. **The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. Annual Review of Microbiology**, Canada, v. 48, p 257 - 89, 1994.

EWING, B.; GREEN, P. **Base-calling of automated sequencer traces using Phred.II error probabilities.** Genome Research, Woodbury, v. 8, 186-194, 1998.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. V.5.2.17.5.

FISCHER, F.; COOK, N.B. **Micologia: fundamentos e diagnóstico.** Editora Revinter: Rio de Janeiro, 2001.

FGUIRA, L.F.B.; FOTSO, S.; MEHDI, R.B.A.; MELLOULI, L.; LAATSCH, H. **Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated Streptomyces sp. Strain US 80.** Research in Microbiology, Paris, France, v. 156, p. 341-347, 2005.

GARCIA-QUITANA, H.; ZAROR, C.L.; LEIVA, P.S. **Efecto antibiótico de cepas silvestres de Streptomyces aisladas de suelos chilenos**. Rev Med Chile 125: 1157-1164. 1997.

GONZÁLEZ, I.; SACIDO, A. A.; ANDERSON, A.; GENILOUD, O. **Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences.** FEMS Microbiology Ecology, Oxford, England, v. 54, p. 401-415, 2005.

GOODFELLOW, M.; MORDARISKI, M; and Williams, S. T. (1984). **The Biology of actinomycetes (Eds) Academic press**. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.

GOTTLIEB, D. **General consideration and implication of the Actinomycetales**. In: SYKES, G.; SKINNER, F. **A Actinomycetales: characteristics and practical importance**. London: Academic Press, 1973. p. 1-9.

GROTH, I. *et al*. **Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo).** Journal of microbiological methods, Amsterdam, v.36, p.115-122, 1999.

HECK, M. G. **Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces sp.* Linhagem 2S**. UFRGS. Porto Alegre/RS, Brasil. 2007.

HOLT, J.G.; WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v.4, p.2300-2648.

HOLDING, AJ. **The proporties and classification of the predominant Gram-negative bacteria occurring in soil.** J Appl Bacteriol v. 23, n. 3 p. 25-515, 1960.

HORAN, A. C. **Secondary metabolite producing actinomycetes other than Streptomyces.** In: **ENCYCLOPEDIA of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation.** Oxford : Black Well Scientific, 1999. p. 2333-2348.

IWAI, Y.; TAKAHASHI, Y. Selection of microbial sources of bioactive compounds. In: OMURA, S. (Ed.). **The search bioactive compounds from microorganism**. New York: Spring-Verlag, 1992. p. 281-302.

KAMEL, Z.; KHALIL, M.S.; SHALABY, A.M. **Calcium and the biological activities of two *Streptomyces* species isolated, from the rizosphere of soybean plants**. Journal of Basic Microbiology, Berlin, v.29, p.31-39, 1989.

KEAST, D.; TONKIN, C. **Antifungal activity of western australian soil actinomycetes against Phytophthora and Pythium species and a mycorrhizal fungus, Laccaria laccata**. Australian Journal of Biological Sciences, Melbourne, v.36, n.2, p. 191-203, 1983.

KENNEDY, AC. Bacterial **diversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems and* Environment.** 1999; 74:65-76.

KIM, G. J. *et al*. Purification **and characterization of an erythromycin resistant *Pseudomonas sp*.** GD 100. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam,v. 210, p. 239-244,2002.

KNOWLES, D. J. C. **New strategies for antibacterial drug design**. *Trends Microbiology*., v 5, p. 379-382,1977.

KOMORI, T.; TRICHOMYCIN, B. **A Polyene Macrolide From *Streptomyces*.** J Antibiot 1990; 43(7): 778-82.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL Jr., V. R.; SOMMERS, H. M. *et al.* **Koneman's Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology Sixth Edition.** Lippincott Williams & Wilhins. Philadelphia, PA, 19106, USA, 2006.

KORN-WENDISCH, F.; KÜTZNER, H.J. **The Family *Streptomycetaceae***. In: BALOWS, A; TRÜPER, H.G., DWORKIN, M., SCHULEIFER, K.H. **The prokaryotes**. 2 ed. New York: Springer Verlag, 1992. 1027p.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara.** São Paulo: Editora Guanabara,1999. p.1840-1879.

KURYLOWICZ, W. **Antibióticos, uma revisão crítica**. Recife: Universitária, 1981. 341 p.

KUSTER E & WILLIAMS ST. **Selection of Media for Isolation of Streptomycetes.** Nature 1964; 202:928-29.

LACEY, J. **Actinomycetes in soils, composts and fodders**. In: SYKES, G., SKINNER, F.F. **Actinomycetales: characteristics and pratical importance**. London: Academic Press, 1973. 339p. LARONE, D.H. **Medically impor tant fungi: a guide to identification.** Editora Elsevier: Nova Iorque. 2ª ed., 1993.

LAZZARINI, A. *et al*. **Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics.** Antonie Van Leeuwenhoek, Amsterdam, v. 78, p. 399-405, 2000.

LECHEVALIER, H.A. **A Practical guide to generic identification of actinomycetes.** In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M.E., HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** New York: William Wilkins, 1989. v. 4.

LEMOS, R.C. & SANTOS, R.D. 1982. **Manual de descrição e coleta de solo no campo**. 2 ed. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas , 1996. 84p.

LEVY, B.S. **Antibiotic resistance – the problem intensifies.** Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdan, Netherlands, v. 57, p. 1446-14450, 2005.

LEVY, B.S.; MARSHALL, B. Antibacterial **resistance worldwide: causes, challenges and responses.** Nature Medicine supplement, New York, United States, v. 10, p122-129, 2004.

LIMA, O.G.; VIANA, S.P.; CARVALHO, J.P. **Menadione and its stimulant effect on the growth of animals**. *Rev Inst Antibiot 14*: 29-38. 1975.

LIU, N. *et al*. **Bioactivity of endophytic actinomycetes from medicinal plants and secondary metabolites from strain D62.** Wei Sheng Wu Xue Bao, v.47, n. 5, p. 823-827, 2007.

LOCCI, R. **Streptomycetes and related genera**. In: WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore**: Williams & Wilkins, 1989. v. 4, p. 2299-2648.

MACHADO, A; BARROS, E. **Princípios Básicos do uso de Antimicrobianos**. In: BARROS, E.; BITTENCOURT, H.; CARAMORI, M.L.; MACHADO, A. **Antimicrobianos – consulta rápida.** 3.ed. Porto Alegre: Artimed, 2001. p.33 – 35.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Biology of Microrganisms**. 8th Ed, Prentice Hall International, Inc; London, 1997.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia: Fundamentos**. Instituto de Tecnologia ORT. Rio de Janeiro-RJ. 2004.

MARENGO, J.A., TOMASELLA, J., ALVES, L.M., *et al*. **The drought of 2010 in the context of historical droughts in the Amazon region**. National Institute of Science and Technology for Climate Change. São Paulo-SP. 2010.

MARTIN, J. F.; MCDANIEL, L. E. **Production of polyene macrolide antibiotics.** Adv. Appl. Microbiology., v.21, p.1-52, 1977.

MCCARTHY, A.J.; WIILIANS, S.T. **Actinomycetes as agents of biodegradation in the environmental – a review. Gene**, Viena, v.115, p.189-192, 1992.

MEYER, A.; DEIANA, J.; LECLERC, H. **Cours de microbiologie génerale**. Paris: Éditions Médicales Internationales, 1984. 310 p.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO. **O uso de agrotóxicos no Brasil: dimensão e consequências**. Publicado em 2005. Disponível em: <http://www.pronaf.gov.br/dater>. Acesso em: 09 fev. 2012.

MIYADOH, S. **Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microoganisms approach.** Actinomycetologia, Amsterdan, v. 9, p. 100-106, 1993.

MONCIARDINI, P. *et al*. **New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes.** FEMS Microbioly Ecology., Amsterdam, v.1414, p.1-11, 2002.

MOURA, R.A.; WADA, C.S.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T.V. **Técnicas de laboratório**. 3ª edição. Editora Atheneu. São Paulo-SP. 2008. .Pg 264.

MUTH, G.; BROLLE, D. F.; WOHLLEBEN, W. **Genetics of Streptomyces** In: DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. **Manual of industrial microbiology and biotechnology.** 2. ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 353.

NORRBY,S.R.; NORD, C.E.; FINCH, R. **Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health The Lancet Infection Disease.** New York, United States, v. 5, p. 115–19, 2005.

NWOSU, V.C. **Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. Microbiology.** 2001;152:421-30.

OCHI, K. **From microbial Differentiation to Ribossome Engineering. Bioscience, biotechnology, and biochemistry**. Tókio, Japan, v. 71, p 1383- 1386, 2007.

OLIVEIRA, M. F. **Identificação e Caracterização de Actinomicetos Isolados de Processo de Compostagem**. Porto Alegre-RS. 2003.

OLIVEIRA, T. L.; LIMA, E. .O.; SOUZA, I. A.; CORNEJO, L. C. **Atividade antifúngica e cinética de morte microbiana de extratos obtidos de *Streptomyces spp*. isolados de solos paraibanos.** Revista Brasileira de Farmacognosia. Recife-PE, Brasil. 2008.

OMURA, S. Trends **in the search for bioactive microbianl metabolites**. *J. Industrial Microbiol.*, v.10, p. 135-156, 1992.

OUHDOUCH, Y.; BARAKATE,M.; FINANCE, C. **Actinomycete of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities.** European Journal of Soil Biology, Montrouge, v. 37, p. 69-74,2001.

OVERBYE, K.M; BARRETT, J.F. **Antibiotics: where did we go wrong? Drug Discovery Today**. London, England, v. 10, n. 1, p. 45-52, 2005.

PADILHA, G. **Biologia Molecular de Streptomyces e aplicações industriais.** Em Melo, I. S. e Azevedo, J. L. Ecologia Microbiana. Embrapa, Jaguariúna, 327-347, 1998.

PELÁEZ, F. **The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—Can history repeat?** Biochemical Pharmacology, London, England, v.7 1, p.981– 990, 2006.

PEREIRA, J.C. **Obtenção e avaliação de mutantes de *Rhizobium phaseoli* resistentes a antibióticos e fungicidas.** Porto Alegre: UFRGS, 1983. 88p.

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores Rapd e seu potencial farmacológico**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

PRAMER, D. & SCHMIDT, E. L. **Experimental soil microbiology**, Burgess Publishing Company, SaintPaul. 1964.

PROJAN, S.J. **Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? Current Opinion in Microbiology**. London, England, v. 6, p. 427-430, 2003.

RATTI, R. P. **Bioprospecção e purificação de substâncias bioativas produzidas por *Streptomyces tubercidicus,* endofítico isolado de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) do cerrado de São Carlos-SP**. São Carlos-SP. UFSCar, 2010.

RANGASWAMI, G.; OBLISAMI, G. **A study of the correlation between the antagonistic actinomycetes and the physical and chemical properties of some soils of south India**. Indian Phytopatology, New Delhi, v. 20, p. 280-290, 1967.

RODRIGUES, K**. Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos isolados de actinomicetos**, 2006.

SAADOUN, I.; GHARAIBEH, R. **The Streptomyces flora of Badia region of Jordan and its potencial as a source of antibiotics active against antibioticresistant bacteria.** Journal of Arid Environments, London, England, v. 53, p365-371, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGLIER, J. J. *et al*. **Review of actinomycete compouds. Expert Opinion and Investigational Drugs, Boston**., v. 5, p. 207-223, 1996.

SANGLIER, J.J.; HAAG, H.; HUCK, T.A.; FEHR, T**. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992)**. *Res Microbiol* 1993; 144: 633-42.

SCHLINGMANN, G.; MILNE, L.; BORDERS, D. B.; CARTER, G. T. **Strevertenes, antifungal pentaene macrolídeos produced by Streptoverticillium LL-30F848.** Tetrahedron, v.55, p. 5977-5990, 1999.

SHIKI, S. Sistema agroalimentar no cerrado brasileiro. In: SHIKI, S.; SILVA, J.G. da; ORTEGA, A.C. (Org.). **Agricultura, meio ambiente e sustentabilidade do cerrado brasileiro**. Uberlândia: UFU, 1997. p.135-166.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. **Methods for Characterization of Streptomyces species.** International Journal of Systematic Bacteriology, Iowa, England, v. 16, p. 313-340, 1966.

SIMMON, K.E.; CROFT, A.C.; PETTI, C.A. **Application of SmartGene IDNS software to partial 16S rRNA gene sequences for a diverse group of bacteria in a clinical laboratory.** *J. Clinical Microbiology., 44, 4400-4406.* 2006.

SOARES, W.L.; PORTO, M.F.; **Agricultural activity and environmental externality: an analysis of the use of pesticides in the Brazilian savannah**. Ciência & Saúde Coletiva, v. 12, n. 1, p. 131-143, 2006.

SOUZA, R. F. et al. **Streptomyces lunalinharesii sp. nov., a chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil in Brazil**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 58, n. 12, p. 2774-2778, 2008.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. **Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria class nov.** International Journal of Systematic Bacteriology, Iowa, England, v. 47, p. 479-491, 1997.

STANLEY, T. W.; SHARPE, M. E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** v. 4. Williams & Wilkins, 1989.

STROBEL, G. & DAISY, B. **Bioprospecting for Microbial Endophytes and their natural productis**. Microbiology and Molecular Biology Review 67:491-502, 2003.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 792p.

THE UNIVERSITY OF ADELAIDE, Austrália. **Identification Keys.** Acesso em: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Keys/Key%20to%20Medically%20Important%20Conidial%20Moulds.html. Disponível em dezembro de 2011.

TRESOLDI, A.T.; BARISON, E.M.; PEREIRA, R.M.; Padoveze, M.C.; TRABASSO, P. **Risk factors associated with the acquisition of multiresistant bacteria in a pedriatic nursery**. *J Pediatr 4*: 275-286. 2000.

UJIKAWA, K. **Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. vol.39 n°2. São Paulo. 2003.

VINING, L.C. Secondary Metabolism. In: REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 Volumes.** Weinhein : VCH, 1986. v. 4, p19-38.

ZITOUNI, A.; BOUDJELLA, H.; LAMARI, L.; BADJI,B.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAU, N. **Nocardiopsis and Saccharothrix genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics.** Research in Microbiology, Paris, France, v.156, p. 984-993, 2005.

VARMA, A. & OELMÜLLER, R. **Advanced Techniques in Soil Microbiology**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.

WAKSMAN, S.A. **The actinomycetes: classification, identification and descriptions of genera and species**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1961. 236p

WAKSMAN, S.A**. The actinomycetes: their nature, occurrence, activities, and importance**. Mass.: Chronic. Bot. CO., 1950. 230p.

WANG, Q, G. M. GARRITY, J. M. TIEDJE, AND J. R. COLE. **Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy.** Appl Environ Microbiology. 73(16):5261-7. 2007.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species.** Editora CRC: Nova Iorque. 2ªed., 2002.

WATVE, M.G.; TICKOO, R.; MAITHILI M. ; BHALACHANDRA, J.; BHOLE, D. **How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces?** Archives of Microbiology. Berlin, Germany, v.176, p.386–390, 2001.

WILLIAMS, S.T.; DAVIES, F.L. **Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil**. Journal of Genetics Microbiology, v.38, p. 251-261, 1965.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E. M. H.; SNEATH, P. H. A.; SACKIN, M. J. **Numerical Classification of Streptomyces and related genera.** Journal of General Microbiology, London, England, v.129, 1743-1813, 1983.

WOODRUFF,M. B. **Productivity and species richness across an environmental gradiente dependent ecosystem.** Science 80, Washington, p. 1225-1229,1980.

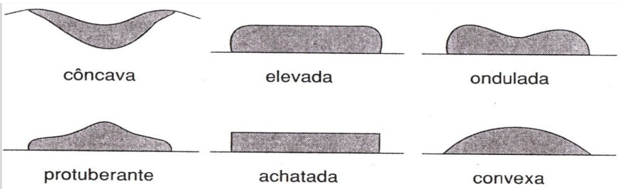
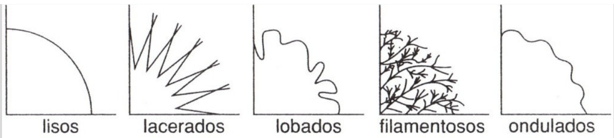
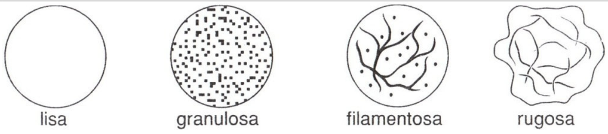
Sites:

1. http://www.infectologia.org.br/default.asp?site_Acao=&paginaId=134&mNoti_Acao=mostraNoticia&noticiaId=25923 – Acessado em: 5/09/20012.

2. http://www.drsandro.org/saude/uso-sem-controle-de-antibiticos-ameaa-a-sade-da-populao/ – Acessado em: 5/09/20012.

3. http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=492– Acessado em: 10/09/20011.

APÊNDICE A – Características macromorfológicas analisadas nas colônias isoladas.

Características	**Morfologia das colônias isoladas**
Consistência/aspecto	Butirácea, viscosa, úmida, membranosa, quebradiça, leitosa, outra.
Cor	Branca, amarela, preta, camurça, laranja, outra.
Brilho	Brilhante, Opaca, Translúcida, Transparente, outra.
Superfície	Brilhante, Fosca, outra.
Tamanho	Diâmetro em milímetros (Grande ≥ 5 mm) (Média = 2 a 5 mm) (Pequena ≤ 2 mm).
Elevação	
Forma	
Margem/Borda	
Estrutura	

Fonte: Koneman *et al*., (2006).

APÊNDICE B – Resultados obtidos nos ensaios de estrias cruzadas para inibição dos micro-organismos-controle pelos micro-organismos isolados.

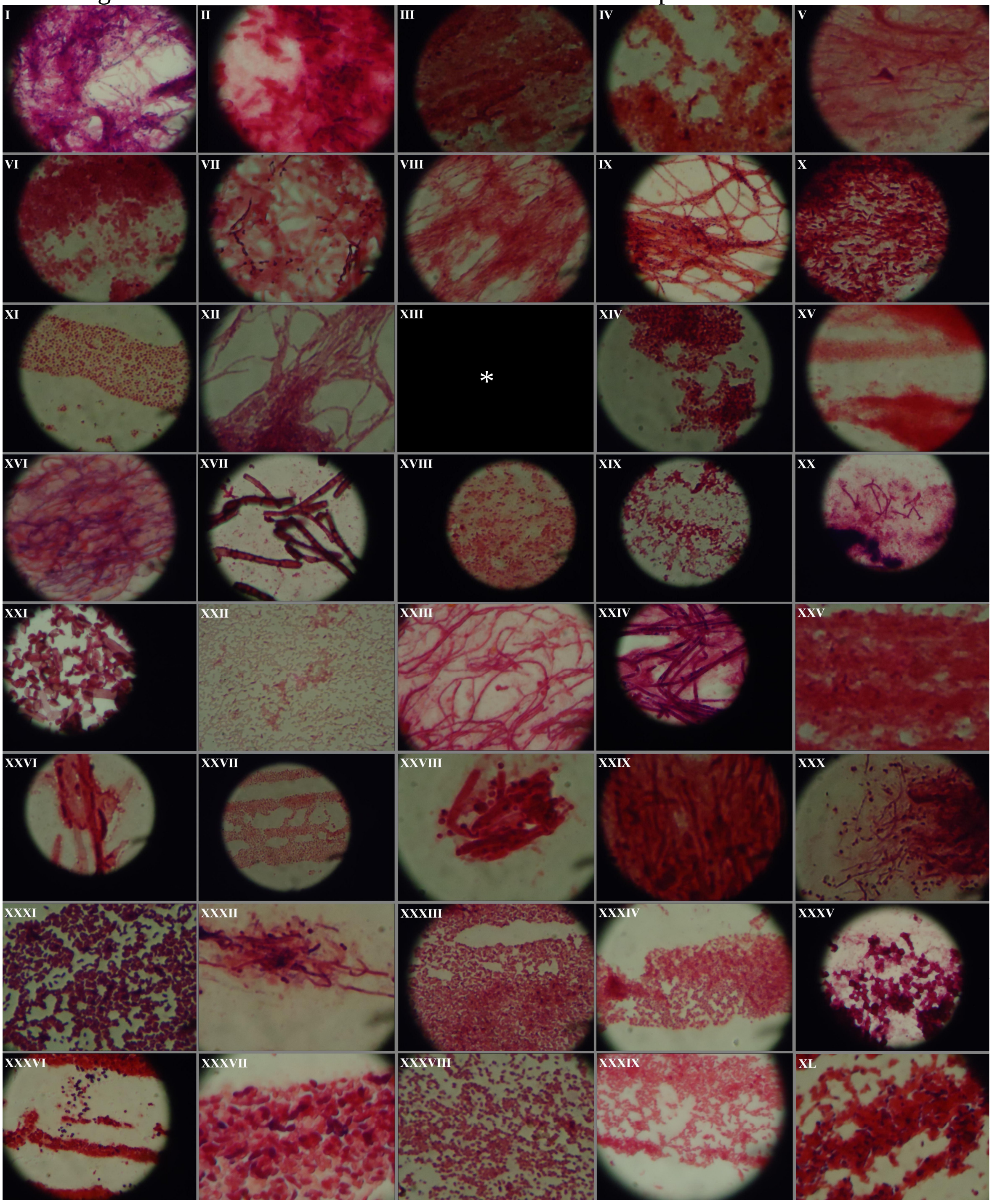
Isolado 01	**Meio Ágar Bennett**			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	12 mm	15 mm	2 mm	6 mm
	Meio Amido-Caseína Ágar			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	SC	13 mm	18 mm	SC
	Meio Ágar LB			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	0 mm	12 mm	0 mm	0 mm
Isolado 03	**Meio Ágar LB**			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	>3 mm	>5 mm	>5 mm	>3 mm
	Meio Ágar m29			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	>7 mm	>3 mm	12 mm	>3 mm
	Meio Ágar Bennett			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	10 mm	>3 mm	11 mm	>3 mm
Isolado 05	**Meio Ágar Sabouraud**			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	8 mm	5 mm	12 mm	7 mm
	Meio Ágar Bennett			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	11 mm	6 mm	8 mm	9 mm
	Meio Ágar m29			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	6 mm	>2 mm	7 mm	>6 mm
Isolado 08	**Meio Ágar Sabouraud**			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	11 mm	0 mm	9 mm	9 mm
	Meio Ágar Bennett			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	17 mm	>8 mm	15 mm	18 mm
	Meio Ágar m29			
	Sthaphylococcus	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
	16 mm	>7 mm	>12 mm	18 mm

Isolado	Meio	*Sthaphylococcus*	*Candida*	*Mycobacterium*	*Pseudomonas*
Isolado 09	**Meio Ágar Bennett**	0 mm	0 mm	3 mm	0 mm
	Meio Ágar m29	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	Meio Ágar LB	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Isolado 16	**Meio Ágar Sabouraud**	SC	>1 mm	8 mm	12 mm
	Meio Ágar m29	4 mm	>1 mm	>3 mm	3 mm
	Meio Ágar Bennett	SC	5 mm	>13 mm	>18 mm
Isolado 19	**Meio Ágar m29**	1 mm	9 mm	>2 mm	1 mm
	Meio Ágar Sabouraud	SC	0 mm	21 mm	18 mm
	Meio Ágar Bennett	3 mm	SC	16 mm	12 mm
Isolado 20	**Meio Ágar Sabouraud**	0 mm	0 mm	1 mm	0 mm
	Meio Ágar Bennett	1 mm	0 mm	3 mm	1 mm
	Meio Ágar m29	0 mm	0 mm	>2 mm	0 mm

Isolado	Meio	Sthaphylococcus	Candida	Mycobacterium	Pseudomonas
Isolado 21	**Meio Ágar LB**	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	Meio Ágar m29	0 mm	1 mm	0 mm	2 mm
	Meio Ágar Bennett	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Isolado 23	**Meio Ágar Bennett**	2 mm	1 mm	0 mm	1 mm
	Meio Ágar m29	3 mm	>1 mm	>3 mm	3 mm
	Meio Ágar Sabouraud	16 mm	4 mm	18 mm	15 mm
Isolado 25	**Meio Ágar Sabouraud**	0 mm	1 mm	0 mm	0 mm
	Meio Ágar m29	0 mm	2 mm	0 mm	0 mm
	Meio Ágar Bennett	3 mm	*Candida albicans* 3 mm	0 mm	4 mm
Isolado 40	**Meio Ágar Bennett**	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	Meio Ágar LB	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	Meio Ágar Sabouraud	0 mm	0 mm	8 mm	0 mm

Fonte: o autor.

APÊNDICE C – Microfotografias dos esfregaços corados pelo método de Gram dos micro-organismos isolados do solo da savana amazônica amapaense.



Fotomicrografias dos micro-organismos isolados. I – isolado 01; II – isolado 02; III – isolado 03; IV – isolado 04; V – isolado 05; VI – isolado 06; VII – isolado 07; VIII – isolado 08; IX – isolado 09; X – isolado 10; XI – isolado 11; XII – isolado 12; XIII – *****; XIV – isolado 14; XV – isolado 15; XVI – isolado 16; XVII – isolado 17; XVIII – isolado 18; XIX – isolado 19; XX – isolado 20; XXI – isolado 21; XXII – isolado 22; XXIII – isolado 23; XXIV – isolado 24; XXV – isolado 25; XXVI – isolado 26; XXVII – isolado 27; XXVIII – isolado 28; XXIX – isolado 29; XXX – isolado 30; XXXI – isolado 31; XXXII – isolado 32; XXXIII – isolado 33; XXXIV – isolado 34; XXXV – isolado 35; XXXVI – isolado 36; XXXVII – isolado 37; XXXVIII – isolado 38; XXXIX – isolado 39; XL – isolado 40. Fonte: o autor.

* Não foi possível obter uma boa fotomicrografia do isolado 13.